

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Brno, 2017

Bc. Barbora Pavlatovská



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

EXTRACELULÁRNÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY PŮDNÍCH KVASINEK

EXTRACELLULAR ENZYME ACTIVITIES OF SOIL YEASTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Barbora Pavlatovská

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Eva Stratilová, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1055/2016
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Barbora Pavlatovská**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Eva Stratilová, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Extracelulární enzymové aktivity půdních kvasinek

Zadání diplomové práce:

Cílem práce je studium aktivity extracelulárních enzymů vybraných půdních kvasinek. V rámci práce realizované na Chemickém ústavu SAV v Bratislavě budou řešeny následující dílčí úkoly:

- a) Vypracování literárního přehledu k problematice extracelulárních enzymů kvasinek
- b) Popsání použitých metod hodnocení enzymových aktivit kvasinek
- c) Stanovení extracelulárních enzymových aktivit kvasinek izolovaných z různých typů půd
- d) Zhodnocení získaných výsledků formou diskuse

Termín odevzdání diplomové práce: 12.5.2017

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Barbora Pavlatovská
student(ka)

Ing. Eva Stratilová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Předložená práce se zabývá schopností kvasinek, izolovaných z půdy pod ovocnými stromy a z kontaminované půdy oblasti Pernek jihozápadního Slovenska, produkovat extracelulární enzymové aktivity. Celkem bylo screeningu podrobeno 68 kmenů kvasinek náležících k 45 různým druhům a testována byla schopnost produkce polygalakturonáz, lipáz, celuláz, proteáz, β -glukosidáz, α -amyláz a schopnost tvorby škrobu podobného polysacharidu. V rámci diplomové práce byla také provedena optimalizace metody pro stanovení chitinázové aktivity u kvasinek. Testována byla vhodnost celkem čtyř metod využívající jednak kultivaci na pevném tak v kapalném médiu. Zároveň byla prověřena vhodnost koloidního a nerozpustného chitinu pro kultivaci kvasinek. Jako nejvhodnější byla vyhodnocena kultivace kvasinek v kapalném médiu s koloidním chitinem a následná detekce chitinázové aktivity Ehrlichovým testem. Tato metoda byla posléze použita pro stanovení extracelulární chitinolytické aktivity všech 68 kmenů kvasinek.

Více jak 75 % testovaných kvasinek vykazovalo alespoň jednu enzymatickou aktivitu a pouze deset kmenů bylo zcela enzymaticky neaktivních. Nejčastěji produkoványmi enzymy byly extracelulární lipázy, proteázy a β -glukosidázy a naopak méně častá byla produkce chitináz a celuláz. Širší spektrum enzymatických aktivit vykazovaly kvasinky izolované z půdy pod ovocnými stromy než kvasinky z kontaminovaných půd.

Největší produkce extracelulárních enzymů byla pozorována u *Aureobasidium pullulans*, CCY 27-1-134, který vykazoval všechny testované aktivity, ale neprodukoval polysacharid podobný škrobu. Druhými největšími producenty byly druhy *Cystofilobasidium macerans* a *Tausonia pullulans*. Navíc tyto druhy vykazovaly vnitrodruhovou variabilitu v produkci lipáz a polygalakturonáz. Zástupci rodu *Cryptococcus* byli nejčastěji producenty lipáz, α -amyláz a β -glukosidáz, ale schopnost produkce jednotlivými kmeny se poměrně výrazně lišila. Pro všechny testované kmeny rodu *Galactomyces* byla stanovena produkce polygalakturonáz a všechny kmeny rodu *Candida* a *Cyberlindnera* produkovaly β -glukosidázy.

Pro všechny kmeny druhu *Galactomyces candidum* (CCY 16-3-2, 16-3-4, 16-3-6), *Galactomyces pseudocandidus* (CCY 16-3-1), *Tausonia pullulans* (CCY 30-1-15) a *Trichosporon asahii* (CCY 30-19-1) byly sestaveny aktivitní křivky produkce polygalakturonáz a růstové křivky v průběhu kultivace (168 hodin). Kmen *Galactomyces candidum* CCY 16-3-2 byl vyhodnocen jako nejlepší producent termostabilních polygalakturonáz, které by bylo vhodné blíže charakterizovat.

Výsledky screeningu poukazují na mnohdy výrazný vnitrodruhový rozdíl v produkci enzymatických aktivit, takže pro biotechnologické využití těchto enzymů je vždy nutné vybrat a charakterizovat přímo daný produkční kmen a nelze v tomto směru očekávat shodné chování ani přes jejich prokázanou příbuznost.

KLÍČOVÁ SLOVA

Extracelulární enzymové aktivity, půdní kvasinky, screening, chitinázy

ABSTRACT

Yeasts form significant and important part of pedosphere microbiota. They keep nature balance, participate in cycles of elements and nutrients, are antagonists of various pathogens and as important decomposers, they produce the whole spectrum of different extracellular enzymes.

The aim of this study was to determine the ability of yeasts, isolated from the soil adjacent to the fruit trees in Southwest Slovakia as well as from the contaminated soil (Pernek area, Slovakia), to produce extracellular enzymes. In total, 68 strains belonging to 45 different species were tested for the production of starch-like polysaccharide and for extracellular enzyme activities: polygalacturonases, lipases, proteases, cellulases, chitinases, β -glucosidases and α -amylases.

This work was also focused on optimization of method for the yeast chitinase assay. Four methods were proved; two of them utilized liquid medium with chitin (colloidal and insoluble) as the sole carbon source and two others used solid plate methods with agar medium containing chitin. Based on results, cultivation in colloidal liquid chitin medium, terminated by the chitinase assay according to Ehrlich, was evaluated as the best method for detection of predominant exochitinase activity of yeasts.

More than 75 % of tested yeasts exhibited some extracellular activity. Generally, the yeasts isolated from the soil under the fruit trees showed broader spectrum of enzyme activities than those originated from contaminated soils. Lipases, proteases and β -glucosidases were found to be the most common activities. Only small proportion of yeasts was able to produce chitinases and/or cellulases.

Aureobasidium pullulans, CCY 27-1-134, from the soil adjacent to the apple tree, showed the widest range of activities from all tested strains and it possessed all examined activities. On the other side, it did not produce starch-like polysaccharide. *Tausonia (Trichosporon) pullulans* and *Cystofilobasidium macerans* were the second most active producers of extracellular enzymes with variations in production of cellulases and α -amylases. Representatives of the former polyphyletic genus *Cryptococcus* exhibited lipases, β -glucosidases, α -amylases and they were producers of the starch, but the interspecies differences were also noted. All strains of the genus *Galactomyces* were positive for polygalacturonases and the genera *Candida* and *Cyberlindnera* were positive for β -glucosidases.

All strains of *Galactomyces candidum* were tested for the production of polygalacturonases during 168 hours long cultivation on pectin media. Strain CCY 16-3-4 showed very stable growth on this medium and simultaneously exhibited significant amount of extracellular polygalactouronases. It has a potential to be very suitable producer of these enzymes but particular characterization of properties is necessary for its future use.

Results of the screening showed that the production of extracellular enzymes is mostly strain-dependent and not species-dependent.

KEY WORDS

Extracellular enzyme activities, soil yeasts, screening, chitinases

PAVLATOVSKÁ, B. *Extracelulární enzymové aktivity půdních kvasinek*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 95 s. Vedoucí diplomové práce
Ing. Eva Stratilová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych na tomto místě poděkovala především své vedoucí diplomové práce, Ing. Evě Stratilové, PhD., nejen za odborné vedení, ochotu, cenné rady a trpělivost při zpracování celé diplomové práce, ale také za to, jakou mi byla a je oporou a inspirací při důležitých krocích mého vysokoškolského studia a v neposlední řadě za to, jaká je. Velmi si této spolupráce vážím. Mé poděkování patří i prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za konzultace a umožnění pobytu na Slovenské akademii věd a Fakultě chemické VUT v Brně za finanční podporu, bez které by tato závěrečná práce nemohla být realizována.

Dále bych chtěla poděkovat Ing. Haně Dudášové, PhD., Bc. Barboře Stratilové a celému výzkumnému týmu Oddělení glykobiologie a Sbírký kultur kvasinek, CHÚ SAV v Bratislavě za pomoc při měření a práci v laboratoři.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	Půda jako prostředí pro život.....	9
2.1.1	Pevná složka půdy	9
2.1.2	Kapalná fáze	10
2.1.3	Plynná fáze	10
2.2	Podmínky pro život mikroorganismů v půdě	11
2.2.1	Abiotický stres.....	11
2.2.2	Biotický stres.....	13
2.3	Kvasinky	14
2.3.1	Výskyt	14
2.4	Půdní kvasinky	15
2.4.1	Diverzita půdních kvasinek	15
2.4.2	Charakteristika vybraných zástupců půdních kvasinek.....	18
2.4.3	Biotechnologické využití kvasinek	30
2.4.4	Význam půdních kvasinek v přírodě.....	30
2.5	Extracelulární enzymové aktivity	36
2.5.1	Proteázy	37
2.5.2	Lipázy	37
2.5.3	Glykosidázy.....	37
2.5.4	Lakázy	39
3	CÍL PRÁCE.....	40
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	41
4.1	Materiál a přístroje.....	41
4.1.1	Chemikálie	41
4.1.2	Biologický materiál	42
4.1.3	Přístroje	43
4.1.4	Pracovní pomůcky.....	44
4.2	Příprava roztoků	44
4.2.1	Média použitá pro kultivaci kvasinek a stanovení extracelulárních enzymových aktivit.....	44
4.2.2	Roztoky použité pro vyhodnocování extracelulárních enzymových aktivit	47

4.3	Metody.....	49
4.3.1	Příprava, kultivace mikroorganismů a stanovení extracelulárních enzymových aktivit.....	49
4.4	Optimalizace metody pro stanovení extracelulární chitinázové aktivity.....	52
4.4.1	Testování chitinázové aktivity při kultivaci na pevném médiu.....	52
4.4.2	Testování chitinázové aktivity při kultivaci v kapalném médiu	53
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	56
5.1	Optimalizace metody pro screening chitinázové aktivity kvasinek	56
5.2	Testování extracelulárních enzymových aktivit kvasinek.....	60
5.2.1	Polygalakturonázová aktivita	63
5.2.2	Lipázová aktivita	69
5.2.3	Proteázová aktivita	70
5.2.4	Celulázová aktivita.....	72
5.2.5	β -glukosidázová aktivita	73
5.2.6	α -amylázová aktivita	74
5.2.7	Chitinázová aktivita.....	75
5.2.8	Produkce škrobu podobných polysacharidů.....	76
6	ZÁVĚR.....	78
	ZDROJE LITERATURY	80
	ZDROJE OBRÁZKŮ.....	90
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	91
	PŘÍLOHA.....	92

1 ÚVOD

Půda je vysoce specifické prostředí pro život a organismy, které v ní existují, musejí být adaptováni na stresové faktory, které přináší. Organismy v půdě vytváří mikrospolečenství, která na sebe vzájemně působí a ovlivňují tak současně výslednou strukturu a funkci půdy. Půdní mikroorganismy obnovují plodnost půdy, zajišťují koloběh živin, rovnováhu prvků v přírodě, regulují množství škůdců, podílí se na revitalizaci a také tvoří složku potravního řetězce. Součástí těchto mikrospolečenství jsou také půdní kvasinky, kterých se zde vyskytuje na 700 druhů, patřících jednak mezi ascomycety, tak basidiomycety. Výskyt kvasinek je výrazně ovlivněn typem a vlhkostí půdy, je limitován hloubkou pod zemským povrchem a kvasinky najdeme zejména v blízkosti jiných mikroorganismů, vláknitých hub nebo kořenů rostlin.

Kvasinky kolonizují půdu přirozeně jen v malém procentu případů, častěji jsou do půdy zavlečeny a musejí se adaptovat. Život kvasinek je přímo závislý na dostupnosti organického uhlíku, proto je zejména v první fázi kolonizace nezbytná schopnost produkce extracelulárních enzymů, které jim zajistí přežití. Vedlejším produktem jejich enzymatické aktivity je rozklad organického materiálu, čímž je zajištěna mineralizace půdy a koloběh živin v přírodě. Produkce extracelulárních enzymů mikroorganismy je ale také čím dál více žádaná v různých odvětvích průmyslu, protože syntetická výroba těchto proteinů je stále z ekonomického hlediska nevýhodná.

Své uplatnění nacházejí mikrobiální proteázy při výrobě detergentů nebo v potravinářství při výrobě piva a ovocných džusů, lipázy v sýrařském průmyslu, ale také při výrobě léčiv nebo v odpadovém hospodářství. Glykosidázy se používají při výrobě bioethanolu, jako stabilizátory, čířidla a pro tvorbu flavouru vín. Nesporný význam má produkce extracelulárních enzymů mikroorganismy také v zemědělství, protože je díky nim zajištěna dostatečná kapacita živin obdělávaných polí, čímž roste i efektivita hospodářství.

Přestože je půda bohatým rezervoárem kvasinek, jejich chování a zákonitosti produkce enzymů v závislosti na zdroji uhlíku a životních podmínkách, byly jen málo popsány. Naopak s ohledem na to, že mikrobiálně produkováné enzymy nacházejí biotechnologické využití především v potravinářství nebo farmacii, je důkladná charakterizace produkčních mikroorganismů i jím produkovaných enzymů nutností. Předložená práce se proto zabývá prvním krokem charakterizace potenciálně produkčních kmenů kvasinek izolovaných z půd, a sice screeningem vybraných extracelulárních enzymových aktivit.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Půda jako prostředí pro život

Půda je nejsvrchnější tenká vrstva povrchu Země, která tvoří rozhraní mezi atmosférou a zemským jádrem, je intenzivně spojena s hydrosférou a formuje životní prostředí pro veškerou biomasu světa. Přesto, že zabírá jen asi 30 % zemského povrchu, je to materiál složený z rozmanitého spektra minerálních i organických složek a rozdílně organizovaných živoucích frakcí, které formují život na Zemi tak, jak jej známe dnes. Půda a její diverzita se primárně starají o samotné formování půdy, obnovu její plodnosti, udržují stálé složení atmosféry skrze zásobu uhlíku, slouží jako prevence eroze, regulují distribuci škůdců a patogenů, podílí se na dekontaminaci a nápravě odpadů, a především utváří životní prostředí a potravu pro mnoho rozdílných organismů [1]. Život v půdě je opravdu pestrý, na jeden gram půdy připadá asi 10^9 bakterií, 10^5 prvoků, 10^2 hlístic a 1 km houbových hyf [2], a přesto zabírají tyto organismy jen asi 1 % z celkového vnitřního prostoru půdy [3]. Půdy jsou extrémně komplexní a heterogenní v prostoru i čase [1]. Komplexita půdy je tvořena dvěma složkami: abiotickou a biotickou [3].

Abiotická složka představuje půdní architekturu a je tvořena anorganickými částicemi různé velikosti, pískem, bahnem a jílem. Tyto částice formují strukturu půdy, čímž přímo ovlivňují její chemii, transport živin a možnost pohybu organismů v půdě [3].

Biotická složka půdy je tvořena rostlinnou vegetací, živými organismy a tlejícími zbytky jejich těl, které formují humus. Živiny uvolněné během degradace mrtvých těl jsou následně využívány půdními mikroorganismy a novou vegetací, čímž je zajištěn koloběh živin a života na Zemi [3].

Půda je výsledkem zvětrávání vlivem působení klimatu a živých organismů v průběhu času [3]. Je tvořena vysoce organizovanou sítí pevné, kapalné a plynné fáze v pórech. Systém půdních pórů tvoří propojené 3D labyrinty, jejichž velikost se pohybuje v rozmezí mnoha řádů. Tyto prostory poskytují možnost pro život extrémního množství typů organismů, zajišťují koloběh vody, vzduchu a živin [1]. Všechny vnitřní vrstvy půd jsou tvořeny třífázovými systémy: pevnou složkou, kterou tvoří anorganická a organická hmota, kapalnou a plynnou (atmosférickou) složkou. Vlastnosti půd se odvíjí od specifického složení každé z těchto fází [3].

2.1.1 Pevná složka půdy

Půda obecně obsahuje 45 - 50 % pevných částic na jednotku objemu. Toto množství je z 95 - 99,5 % tvořeno minerály. Nejčastěji se vyskytujícími prvky v minerální frakci zemského povrchu jsou křemík (47 %) a kyslík (27 %), které spoluutvářejí další sloučeniny (např. SiO_4). Základním typem částic jsou písky, kaly a jíly, které vytváří texturu půdy [3].

Částice se v půdě nevyskytují jednotlivě, nýbrž formují sekundární půdní architekturu. Tyto částice jsou pak spojeny dohromady mikrobiálními metabolity, jako jsou gumy a slizy a formují tak sekundární agregáty. Částice jsou rovněž spojeny fyzikálně, a to kořenovým systémem rostlin a prostřednictvím houbových hyf. Tyto sekundární agregáty se nazývají pedy a v závislosti na primárních částicích mají různý tvar a velikost. Uvnitř agregátů a také mezi nimi vznikají póry, které jsou rozhodující pro výslednou půdní architekturu [3]. Póry vyplňují

zhruba 30 - 60 % objemu půdy, především v horních patrech. Celkem rozeznáváme tři velikosti pórů, a to mikro, makro a meso póry, avšak bez ohledu na jejich velikost, jejich propojení je výraznou limitací pro život a pohyb mikroorganismů v půdě [1]. Půdní architektura je také nezbytná pro regulaci přenosu vody, její zadrž, výměnu plynů a redox potenciálu. Zároveň tyto struktury utváří aerobní i anaerobní prostředí pro život organismů.

Půdy s obsahem jílu mají většinou dobře organizované pedy, a tím vytvářejí také dobrou strukturu půdy. Pokud není půda narušena, struktura je komplexní a drží pohromadě. Problémem těchto půd je to, že zadržují vodu, jsou špatně provzdušňované a znemožňují pohyb mikroorganismů. Písčité půdy mají naopak menší soudržnost než půdy jílovité, což je způsobeno tím, že póry mezi částicemi jsou mnohem větší, v pórech je dostatek vzduchu a mikroorganismy se mohou volněji pohybovat. Nevýhodou může být, že písčité půdy jsou náchylné k vysychání a jsou chudé na živiny [3].

Organická složka půd

Půda je obecně platným rezervoárem uhlíku, mnohem větším než je biosféra a atmosféra dohromady [2]. Obsah organické hmoty v půdě se uvádí v řádech 20 - 100 Mg/ha [1]. Většina organické hmoty je tvořena rostlinnými nebo živočišnými zbytky v různých stádiích rozkladu [2]. Tyto organické hmoty se zdají být vhodným a dostupným zdrojem potravy v půdě, nicméně jsou to látky obtížně rozložitelné nebo stravitelné [1]. Huminové látky vznikají při degradaci živých zbytků biomasy, a ač v půdě tvoří stabilní komplexy s jílovými materiály, jsou základním, pomalu se uvolňujícím zdrojem uhlíku a energie v půdě pro pomalu rostoucí autochtonní mikroorganismy [1, 3].

Struktura humusu je tvořena 3D houbovitou sítí, která obsahuje hydrofilní i hydrofóbní oblasti. Hydrofilní oblasti jsou orientovány směrem ven z půdy a interagují s vodou nebo s minerály. Hydrofóbní oblasti jsou orientovány směrem do půdy a interagují s látkami méně polárními než voda. Organické složky půdy obsahují důležité funkční skupiny (hydroxylové, karboxylové), které svým chováním ovlivňují pH půdy, iontové interakce a sorpci roztoků [3].

2.1.2 Kapalná fáze

Vodná fáze tvořící půdu je neustále se měnící koloidní roztok organických a anorganických látek, který vyplňuje pórovité prostory mezi pevnými agregáty [3]. Složení vodné fáze je extrémně důležité pro biologickou aktivitu v porézním médiu, protože mikroorganismy jsou ze 70 % vodní nebo alespoň vyžadují vodu pro svoji aktivitu a správnou funkci metabolismu. Ve většině případů jsou mikroorganismy žijící v půdě obaleny vodním filmem, ze kterého přijímají živiny. Množství a složení vodné fáze řídí také mikrobiální a rostlinný růst. Půdní roztok odráží výslednou chemii půdy a její dynamiku. Pohyb vody v půdě je závislý na vnějších faktorech jako jsou deště a zadrž vody, má vliv na rozpad minerálů, formování organických sloučenin a dekompostování, ovlivňuje dostupnost živin a pohyb mikroorganismů v půdě [3].

2.1.3 Plynná fáze

Pedosféra a atmosféra jsou v neustálém přímém kontaktu, z toho důvodu jsou plyny obsažené v půdě stejné jako v atmosféře, a to dusík, kyslík a oxid uhličitý [3]. Plynné složky vyplňují všechny póry v půdě, které nejsou vyplněny vodou [4]. Obsah plynů se liší v závislosti na zkoumané půdě, přírodních podmínkách a hloubce zemské kůry, v níž se nachází. Obecně

ale platí, že svrchní vrstvy jsou lépe provzdušňované než ty hlouběji položené [3]. Relativní obsah kyslíku a oxidu uhličitého v půdě je přímo ovlivňován mikrobiální a rostlinnou aktivitou. Koncentrace oxidu uhličitého je v půdě asi 10x vyšší než v atmosféře, kyslík zabírá 10 – 20 % objemu půdy [4]. Obsah kyslíku je vitální pro aerobní aktivitu, protože je finálním akceptorem elektronů vznikajících při oxidaci organických látek. Při absenci kyslíku dochází k anaerobní respiraci nebo mineralizaci substrátu oxidem uhličitým, což je pro organismy žijící nejen v půdě nežádoucí proces [3].

Jak už bylo zmíněno, obsah kyslíku je v půdě nezbytný pro život aerobních organismů. Jeho koncentrace je vyšší v písčitých půdách, ale naopak koncentrace živin je zde menší. Ve vlhkých půdách, bohatých na živiny, dochází k vyplnění pórů vodou a není zde prostor pro aeraci. Půdy, které mohou zároveň nabídnout vyvážený poměr vody a kyslíku, stejně jako vyváženou kapacitu živin, jsou optimálním prostředím pro život a aktivitu aerobních mikroorganismů [3].

Ve velkých hloubkách pod povrchem Země je aktivita organismů menší, což je způsobeno nedostatkem organického uhlíku jako substrátu. Kyslíková dostupnost v těchto zónách se značně liší, právě v závislosti na dostupnosti organického substrátu [3].

2.2 Podmínky pro život mikroorganismů v půdě

Půda vytváří vysoce specifické životní prostředí a organismy, které v ní žijí, musejí být adaptovány na stresové faktory a tlaky, které přináší. Kritické pro přežití jsou dva faktory. Prvním z nich je prostor, který je vymezený pro život organismů a může být značně zredukován obsahem vody a druhým je nutnost adaptace organismů na příjem živin nízké kvality, jež pocházejí nejčastěji z tlejících zbytků organického materiálu [1].

V půdě se vyskytují mikroskopické populace, zahrnující kvasinky, bakterie, fágy a prvoky, které žijí vzájemně v těsné blízkosti a společně s obratlovci se podílejí na utváření chemických i fyzikálních vlastností půdy [3, 5]. Mikrospolečenství v půdě se systematicky označují jako edafon, ten je dále rozdělen na mikroedafon, kam spadají bakterie, sinice, řasy a většina hub menších než 0,2 mm, dále na mezoedafon, makroedafon a megaedafon [5].

Půda, ač slouží především jako podpora pro mikroorganismy a rostliny, nabízí poměrně drsné podmínky a prostředí vhodné pro kompetici, kdy nejlépe adaptované organismy získají v půdě nejlepší podmínky pro život. Stresové faktory dělíme na biotické, kdy mikroorganismy čelí tlaku jiné bioty a abiotické, zahrnující fyzikální a chemické faktory [3].

2.2.1 Abiotický stres

Abiotickým stresem se rozumí jakýkoliv nepříznivý stav, který je vyvolán vnějším činitelem, označovaným jako stresor. Často je stres způsoben nadbytkem nebo nedostatkem některého pro organismus esenciálního faktoru. Abiotický stres lze snížit postupným přivykáním organismu na daný stresor [6].

pH

Půdní pH ovlivňuje rozpustnost chemikálií v půdě a rovněž transport potenciálních polutantů, čímž přímo utváří prostředí pro život mikroorganismů. Půdy jsou převážně neutrální a mají pH v rozsahu 6 – 8, přičemž optimální pH pro většinu mikroorganismů spadá právě do tohoto intervalu a jejich nejvyšší aktivita se pohybuje v oblasti pH 6 – 6,5. V oblastech bohatých na deště jsou půdy mnohdy kyselější (pH < 5,5) a bohatší na živiny než v oblastech

suchých, kde je pH zásaditější a půda chudá na živiny. Obecně při vypařování vody z půdy dochází k akumulaci solí, což vede ke zvýšení zásaditosti ($\text{pH} > 8,5$). Mezi půdními organismy ale existují i extrémofilové, kteří pro svůj život preferují hodnotu pH v oblastech vyšších nebo naopak výrazně nižších, než je pH neutrálních půd [3].

Výživa

Přestože na celkovou prosperitu mikroorganismu má vliv komplexní přísun esenciálních prvků, nejvíce limitující faktory pro výživu jsou dostupnost organického uhlíku a dusíku. Pokud jich není zajištěn dostatek, růst mikroorganismů je pomalý a aktivita metabolismu klesá. Mnoho mikroorganismů pak v půdě dorminuje ve stavu tzv. polohladovění [3].

Zdroje výživy v půdě můžeme rozdělit do tří hlavních skupin:

- listy, kořeny a dřevnaté zbytky
- půdní organické hmoty a rozpustné zdroje
- exsudáty a hleny produkované půdními organismy

Nejhojnějším zdrojem jsou tlející zbytky listů a dřeva na povrchu půdy, kořenový materiál a rozpustné organické složky [1]. Biologické smetí obsahující odumřelé orgány rostlin a těl živočichů představuje potenciální zdroj uhlíku v dotaci několika desítek Mg/ha půdy/rok [3]. Přes relativní hojnost jsou to zdroje o nízké výživové hodnotě a není jednoduché je rozložit, protože jsou to komplikované polymery (polyfenoly, lignin) vyžadující specifické trávicí adaptace, popřípadě mohou být pro organismy toxické. Rostliny a větve během opadávání zřejmě translokují energii získanou fotosyntézou, což vysvětluje, proč jsou slabým zdrojem výživy. Uvolnění dusíku z tlejících zbytků provádí především basidiomycety a efektivita procesu závisí na tuhosti a struktuře degradovaných rostlinných a živočišných tkání [1].

Dostupnost vody je kritická pro aktivní metabolismus většiny organismů. Optimální koncentrace vody je za stavu tlaku -1 atm , kdy dochází k přechodu mezi kapilární a volnou vodou. Nejvíce odolné proti vysoušení jsou půdní houby (aktinomycety), následně bakterie a kapsulární kvasinky [3].

Aerace

Aerobní půdní prostředí je často narušováno vodní aktivitou, kdy póry v půdě plní místo vzduchu voda. Zatímco zaplavení pórů je proces velmi rychlý, vysoušení je časově náročné a závisí na rychlosti vypařování vody, popřípadě jejím příjmu rostlinami. Ve velkých pórech se voda drží déle než v malých. Procesy zavodňování a vysoušení se v půdě velmi často střídají, proto je půda velmi nestabilním prostředím, kde se střídají aerobní a anaerobní podmínky. Obojživelnost v půdě přináší specifická omezení ve fyziologii dýchání. Buď se v půdě setkáváme s vodní respirací, která vyžaduje schopnost přímé membránové výměny plynů, tak jak to provádí bakterie, nebo s klasickým dýcháním vyžadujícím cirkulaci vzduchu. Dostupnost kyslíku v půdě závisí na koncentraci organického uhlíku a hloubce pod zemským povrchem tak, jak je popsáno výše. Právě dostupnost kyslíku v půdě je pro organismy velkým stresem a s ohledem na nestabilní podmínky v půdě, týkající se relativního poměru vody a vzduchu v pórech, vyžaduje vysokou míru adaptovatelnosti [3].

Redox potenciál

Redox potenciál půdy znamená tendenci prostředí oxidovat či redukovat substrát. Aerobní půdy, jako oxidující prostředí, mají potenciál +800 mV, anaerobní půdy, které jsou redukujícím prostředím, disponují potenciálem asi -300 mV. Kyslík má v půdě potenciál +800 mV. Pokud je spotřebován jako finální akceptor elektronu mikrobiálním metabolismem a půda nemá možnost další aerace, redoxní potenciál v půdě poklesne a jako finální akceptor elektronu musí být použity jiné látky. Aktivita organismů je při různém redoxním potenciálu různá [3].

Sluneční záření

Sluneční záření mě dvě hlavní složky, které se podílejí na abiotickém stresu, a sice světelnou a tepelnou. Světelné záření má zásadní vliv na biotickou složku ekosystému, protože skrze ni je energie poutána do půdy za vzniku nových organických substrátů. Světlo hraje zásadní roli pro orientaci organismů v půdě, jsou podle něj schopny odlišit směr pohybu nebo např. roční období [7]. Sluneční záření neproniká půdou více, než několika svrchními centimetry, fototrofní organismy jsou proto odkázáni právě na život v těsnosti pod zemským povrchem, popřípadě musí být schopni přeprogramování svého metabolismu na heterotrofní utilizaci živin. Ve světelné části půdy v blízkosti pod povrchem je kritické kolísání nejen teplot, ale i živin, proto je pro tyto organismy typické soužití v symbióze (např. lišejníky) [3].

Tepelná složka záření má vliv na produkční vlastnosti organismů a rostlin, ovlivňuje jejich aktivitu a možnosti přežití, hraje hlavní roli při formování optimálních podmínek pro chemické procesy v půdě a jeho extrémy ovlivňují zvětrávání matečné horniny. Tepelné záření má v půdě vliv také na výpar vody do atmosféry, čímž přímo redukuje vodní zádrž v půdě [7].

Teplota půdy je hodně proměnlivá, a to zejména v oblastech těsně pod zemským povrchem, proto většina organismů musí být odolná vůči jejímu kolísání. Teplota půdy kolísá podle ročních období a také geografické polohy dané oblasti. V závislosti na teplotním optimu dělíme organismy na psychofilní, žijící při teplotách do 20 °C, mezofilní s teplotním optimem 20 - 45 °C, termofilní, s teplotním optimem 45 - 90 °C a hypertermofilní, kteří preferují teploty nad 90 °C [3].

Textura půdy

Textura půdy ovlivňuje porozitu, čímž formuje prostor pro život organismů. Porozita půdy klesá směrem od svrchních vrstev tvořených tlejícími organickými zbytky k hlubším minerálním vrstvám. Velikost pórů se pohybuje v intervalu mikrometrů až decimetrů, malé póry o velikosti mikrometrů jsou typické pro jílovité půdy, velké póry o desítkách až stovkách mikrometrů se nacházejí v půdách písčitých [1]. Organismy vytvářejí své kolonie napříč všemi strukturami půdy, nejpopulárnější jsou ale půdy tvořené kombinací částic písku, bláta a jílu, protože poskytují dostatek vody, živin i vzduchu. Mikroorganismy žijící v půdách jen písčitých nebo jílovitých jsou méně časté a vykazují nižší aktivitu [3].

2.2.2 Biotický stres

Adaptace na život v půdě vygenerovala široké spektrum životních forem se specifickými vlastnostmi, které tvoří bohatou půdní diverzitu. Půda vytváří přírodní izolaci, která může tyto organismy chránit před případnými predátory nebo negativními vlivy životního prostředí [1].

Jak bylo zmíněno výše, půda je regulačním prostředím pro mikrobiální populace, takže život v ní je založen na soutěži. Mikroorganismy mohou soutěžit o vodu, živiny, růstové faktory nebo mezi sebou v interakci predátor-kořist. Mikroorganismy mohou vylučovat jako produkt svého metabolismu látky, včetně antibiotik, které jsou toxické nebo jinak inhibující pro ostatní organismy. Právě kvůli biotickému stresu přežijí nepůvodní zavlečené druhy v půdě jen velmi krátce, a to v řádech hodin, maximálně dnů [3].

2.3 Kvasinky

Kvasinky jsou heterotrofní eukaryotní organismy, které spadají do říše Fungi a jednotlivé zástupce najdeme jak mezi askomycetami, tak mezi basidiomycetami [8]. Jsou to zpravidla jednobuněčné mikroorganismy, přičemž velikost jedné buňky se nejčastěji pohybuje v rozmezí 2-15 μm . Tvar buňky bývá nejčastěji kulovitý, elipsoidní nebo mírně protáhlý. Najdeme ale i kvasinky s netradičním tvarem buňky, jako je citronovitý (např. *Kloeckera apiculata*), trojúhelníkovitý (např. rod *Trigonopsis*) nebo válcovitý (např. rod *Schizosaccharomyces*) [9, 10, 11]. Tvar buněk do jisté míry ovlivňuje prostředí, ve kterém žijí, včetně způsobu kultivace. Tvar buňky také souvisí se způsobem vegetativního rozmnožování, které se děje buď pučením, nebo dělením [9].

Výjimečně kvasinky vytváří pravé mnohobuněčné struktury. Toto se děje v případě, že se protáhlé buňky spojí dohromady za vzniku pseudomycélia nebo pseudohyf. Pseudomycélia vznikají při prodlužování buněk z pupenů, kdy buňky začnou přiléhat k sobě a dochází k větvení řetězce. Jednotlivé buňky pseudomycélia fungují zcela nezávisle na sobě a nejsou propojeny póry [10]. S tvorbou pravého mycélia se můžeme setkat u některých rodů nebo kmenů kvasinek a u plísní. Pravé mycélium vzniká příčným dělením buněk, kdy jsou dvě jádra od sebe oddělena prstencovitou vychlípeninou vzniklou z cytoplazmatické membrány. Tvorba pravých mycélií je charakteristická pro silně aerobní rody, jako jsou např. *Endomycopsis*, *Sporobolomyces*, *Candida* nebo R-mutanti kvasinek [9]. Některé kvasinky tvoří tzv. blastospory, které se seskupují terminálně nebo podélně kolem hyf [10].

Cytologie kvasinek je obdobná jako u ostatních eukaryotických organismů. Buňka je složena z pevné buněčné stěny, cytoplazmatické membrány, cytoplazmy a jádra. Jádro je odděleno od cytoplazmy dvojitou jadernou membránou [9, 12]. Některé kvasinky, např. zástupci rodu *Cryptococcus*, mají povrch těla chráněný kromě buněčné stěny také extracelulární kapsulí z mukopolysacharidů, která jim přináší zvýšenou rezistenci proti nepříznivým vnějším vlivům a je pravděpodobným původcem jejich patogenity [10]. Vegetativní formy kvasinek nemají žádné pohybové orgány, výjimku tvoří pohlavní spory některých rodů [9].

Barva kolonií kvasinek je zpravidla světlá, krémová, ale mohou být vlivem přítomnosti barevných pigmentů i červené nebo černé [12].

2.3.1 Výskyt

Kvasinky, ač nejsou tak ubikvitní jako bakterie, jsou celosvětově rozšířené. Jejich výskyt je přímo závislý na dostupnosti organického uhlíku, protože kvůli absenci chlorofylu nejsou schopné si živiny syntetizovat. Mezi utilizovatelné zdroje uhlíku patří jednoduché cukry, polyalkoholy, organické a mastné kyseliny, alifatické alkoholy, uhlovodíky a další různé

heterocyklické a polymerní sloučeniny. Právě různé nároky na výživu a schopnost zpracovávat uhlíkaté zdroje předurčují biodiverzitu kvasinek [13].

Běžným místem pro život kvasinek jsou rostliny, kolonizují povrchy rostlinných těl a jejich plody [13, 14]. Kvasinky kolonizují také těla zvířat, povrch pokožky nebo osidlují trávící trubici, avšak ve stálé mikroflóře trávícího traktu člověka tvoří kvasinky jen malé procento. Mezi takové zástupce patří např. rody *Candida* nebo *Pityrosporum*. Mnoho kvasinek může být patogenních, a to jak pro zvířata a rostliny, tak i pro člověka [14]. Mezi jednotlivými rostlinami jsou kvasinky rozšiřovány prostřednictvím hmyzu, mezi živočichy a lidmi se rozšiřují nejčastěji současně s potravou [8, 13, 15].

Kvasinky se hojně vyskytují ve vodě, a to jak v sladké, tak v slané. Důležitým faktorem pro jejich růst je čistota vody, její pH, teplota a hloubka, ve které se vyskytují. Obecně platí, že slané vody obsahují méně organismů na litr vody, než sladké. To ale neplatí např. v oblastech ústí řek. Mezi kvasinky vyskytující se ve vodě patří např. rody *Cryptococcus*, *Candida* nebo *Rhodotorula* [13, 16].

S nepatrným množstvím kvasinek, přibližně několik jedinců na m³, se můžeme setkat také ve vzduchu. Nejčastěji se ve vzduchu vyskytují rody *Cryptococcus*, *Candida*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* a *Debaryomyces*, a to proto, že jsou větrem rozšiřovány z povrchu Země.

Někteří zástupci kvasinek se řadí také mezi extrémofily, např. *Debaryomyces hansenii* obývají zasolená prostředí nebo osmofilní *Zygosaccharomyces rouxii* byli izolováni z glaciárního ledovce na Antarktidě.

Prostředím, které ale kvasinky osidlují velice hojně a kde mají nezastupitelnou funkci destruentů, je půda [13].

2.4 Půdní kvasinky

Půdní kvasinky jsou početná skupina organismů, která je součástí půdního edafonu. V současné době je identifikováno více než 100 rodů kvasinek se 700 druhy, které obývají půdu. Mezi zástupci najdeme jak askomycety, tak basidiomycety a jejich rozložení se liší v závislosti na typu půdy [16, 17, 18]. Vyskytují se zpravidla v málo početných koloniích poblíž bakterií, jiných hub nebo kořenových systémů rostlin. Jejich výskyt je limitován hloubkou 15 cm pod zemským povrchem a s klesající dostupností organického substrátu klesá i jejich počet [19]. Mezi exkluzivně půdní rody kvasinek patří např. *Lipomyces* nebo *Schwanniomyces*. Pro mnohé kvasinky je půda spíše prostředím pro dlouhodobé přežití než prostředím pro přirozený volný růst, anebo byly do půdy zavlečeny, například hmyzem, deštěm nebo vlivem zemědělství. Kvasinky, které byly do půdy zavlečeny, se příliš nepodílí na degradaci organické hmoty a koloběhu živin, ale mohou se uplatnit v procesu formování půdy [3, 19].

2.4.1 Diverzita půdních kvasinek

Jak už bylo zmíněno, výskyt kvasinek v půdě je nerovnoměrný a jejich počet se pohybuje v intervalu od 10 do 10⁶ buněk na gram půdy. Jejich počet se odvíjí od vlastností, které půda má. Půdy, které jsou suché a chudé, nabízejí nehostinné podmínky pro život a výskyt kvasinek je nižší. Naopak půdy, které jsou vlhké a bohaté na živiny, jako lesní nebo travnaté půdy, obsahují skutečně až milion buněk v jediném gramu [17]. Dostupnost organického substrátu je pro kvasinky výrazně kritická a hraje důležitější roli pro jejich přežití než teplota nebo pH půd [20].

Obecně můžeme říci, že s měnícím se typem půdy se příliš nemění složení mikroorganismů, ale mění se výrazně jejich počty [4, 18]. Dominantní v půdě jsou kapsulární kvasinky (*Cryptococcus*), nebo kvasinky produkující lipidy (*Rhodotorula*, *Lipomyces*). Ty totiž mají schopnost syntetizovat si polysacharidovou kapsuli navrch buněčné stěny a získávají tak ochranu v období sucha, kdy kapsula zabraňuje nadbytečným ztrátám vody a rehydratuje organismus. Díky ní rovněž kvasinky získávají vyšší rezistenci vůči znečištění půd, těžkým kovům, popřípadě antimykotikům [4, 19-24].

Lesní půdy

Lesní půdy ukrývají původní a neskutečně bohatá společenství mikroorganismů. Půdy zde jsou vlhké, bohaté na živiny a nabízí možnosti pro symbiotická soužití jak s rostlinami, tak s živočichy. Koncentrace kvasinek se v lesních půdách pohybuje v rozmezí 1 500 – 11 000 buněk na gram a kolísá během ročních období. Na biodiverzitu kvasinek v lesních půdách má vliv zásah člověka do krajiny. Negativně je půda ovlivněna např. v Německu, kde je velká míra uměle vysazených jednodruhových lesů s převažujícími buky, která má za následek nízkou druhovou pestrost mikroorganismů. Negativní dopad má také nahrazování lesů zemědělskou půdou nebo zatravňováním, kdy společně s lesy mizí i spektrum půdních kvasinek a dochází ke změně biologických cyklů živin [18].

Převážnou většinou zástupců lesních půd tvoří basidiomycety, a to až z 94 - 99 %, askomycety se vyskytují minimálně. Mezi nejčastěji se vyskytující basidiomycety, bez ohledu na typ lesa, patří *Cryptococcus* (*Cr.*) *laurentii*, *Cystofylobasidium* (*Cys.*) *capitatum*, *Leucosporidium* (*L.*) *scottii*, *Rhodotorula* (*Rh.*) *aurantiaca* a *Trichosporon* (*Tr.*) *cutaneum* [21]. Yurkov a kol. mimo již zmíněné přidává tři zástupce, *Cr. terricola*, *Apiotrichum porosum* a *Apiotrichum dulcitum* [18] a Wuczkowski a kol. rod *Galactomyces* [20]. Mezi nejhojnější lesní askomycety patří rody *Candida*, *Kluveromyces*, *Pichia* a *Williopsis* [20, 25], konkrétně druhy *C. vartiovaarae*, *Kazachstania piceae* (*Kluveromyces piceae*) [18], *Debaryomyces castellii* (*Schwanniomyces castellii*) [21]. Přítomnost kvasinek se liší v závislosti na typu lesa, některé druhy, např. *Tausonia pullulans* kolonizují výhradně smíšené lesy, kvasinky *Tr. cutaneum*, *Tausonia pullulans*, *Aureobasidium pullulans*, *Rh. glutinis* a *Cr. albidus* zase patří mezi primární destruenty smrkového jehličí a jejich přítomnost lze předpokládat právě v takových lesích [21]. *Cr. laurentii* a *Cr. albidus* jsou druhy typické pro chladné oblasti tundry, jejich nálezy pochází i z půdních izolátů pořízených na Antarktidě [26, 27]. Další výrazně psychrofilní kvasinkou, kterou můžeme najít v lesních půdách, ale byla izolována i v oblastech věčného ledu, je *L. scottii* [19]. Pro lesní půdy jsou typické i *Lipomyces*. Ty jsou hojnější ve větších hloubkách, protože nejsou schopny soupeřit o volně dostupný dusík u povrchu Země. Na druhou stranu jsou schopny efektivně využívat substráty s dobře asimilovatelným uhlíkem, čímž si zaručí přežití a mohou tak ve svém počtu v podmínkách nedostatku dusíku výrazně převyšovat ostatní kolonie [19, 28]. *Rhodotorula* a *Cystofylobasidium* jsou rody, které se vyskytují v lesní půdě hojně, ale jejichž přítomnost se v půdě mění v závislosti na ročním období. V jarních měsících je jejich koncentrace vyšší díky dostupné vlhkosti, naopak v létě je nižší kvůli vyšší intenzitě slunečního záření a náchylnosti půd k vysychání [21].

Travnaté půdy

Travnaté půdy lze považovat za druhově méně rozmanité prostředí než lesy, a to zejména kvůli vysoké koncentraci těžko rozložitelných látek, které by posloužily jako substrát. Druhým důvodem je nižší pestrost travnatých porostů, které by kvasinky kolonizovaly a odkud by se mohly dostat do půdy [22, 29]. Na výskyt kvasinek v travnatých půdách má vliv také roční období a s ním spojené teplotní změny a dostupnost živin [30]. Zdroje literatury se v údajích o poměru basidiomycet a askomycet v travnatých půdách liší. Zatímco některé uvádějí, že travnaté půdy jsou typičtější pro ascomycety [18, 23], jiné naopak uvádí, že stejně jako u půd lesních, najdeme v travnatých půdách převážně basidiomycety, a to více jak z 90 % [22]. Mezi nejčastěji se vyskytující kvasinky patří zástupci *Cr. laurentii*, *Cr. albidus*, *Cr. aerius*, *Cys. capitatum*, *Sporobolomyces salmonicolor*, *Tr. cutaneum* a *Tausonia pullulans*. Ve znečištěných půdách se hojně objevují *Rh. glutinis*, *Schwanniomyces castellii* a *Schwanniomyces hansenii*, minoritně pak *C. maltosa*. [18, 20]. *Schwanniomycety* jsou exkluzivně půdními mikroorganismy a objevují se v ní i přes vysokou míru znečištění nebo akumulace těžkých kovů [23]. Travnaté půdy nacházející se v říčních nivách jsou druhově bohaté, protože společně s pravidelnými záplavami přichází do půdy i živiny [20].

Zemědělské půdy

Biodiverzita zemědělské půdy se liší v závislosti na různých faktorech. Vedle ročního období a dostupnosti živin, jde i o to, jaké plodiny jsou pěstovány, zda jsou pole oraná nebo ne a o jaký druh zemědělství se jedná [4, 31, 32]. Čím vyšší plodiny jsou pěstovány, tím lépe chrání půdu před vysušováním a kvasinek je v půdě více. Vlivem orby se počet kvasinek naopak 7-8x snižuje oproti neoraným polím. Pokud jsou pole obdělávána ekologicky, vyskytují se kvasinky spíše u zemského povrchu, do hloubky 5 cm. Pokud se jedná o případy konvenčního zemědělství, pak jsou kvasinky v hloubce asi 30 cm [20]. Negativní vliv orby ale může být spekulativní, protože na jedné straně sice dochází k narušení přirozeného životního prostředí mikroorganismů, na druhou stranu ale mohou být v důsledku orby zavlečeny do půdy i mikroorganismy nové [4, 19]. Jednoznačně negativně se na biodiverzitu podepisuje používání pesticidů, jež vede k akumulaci těžkých kovů a toxických látek v zemi. Počet askomycet a basidiomycet vyskytujících se v zemědělské půdě je téměř stejný. V celkovém srovnání lesních a zemědělských půd jsou kvasinky častěji a ve větší míře přítomny v lesních půdách. V současné době se totiž setkáváme s mnoha poli, která jsou tzv. prázdná, protože na ně byly kladeny vysoké nároky ohledně plodnosti. Tyto půdy jsou chudé na živiny a stejně tak výskyt kvasinek je minimální [4, 17, 18]. V dobře obhospodařované zemědělské půdě se můžeme nejčastěji setkat se zástupci *Cr. laurentii*, *C. maltosa*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Sporobolomyces salmonicolor*, v menší míře se vyskytují *Cystofilobasidium capitatum*, *Tr. cutaneum* a *Tausonia pullulans* [4].

Ohledně biodiverzity půdních kvasinek bylo provedeno mnoho studií. Následující přehled popisuje nejčastěji se vyskytující zástupce kvasinek, se kterými bylo v rámci této studie pracováno.

2.4.2 Charakteristika vybraných zástupců půdních kvasinek

Apiotrichum (Trichosporon) dulcitum

Apiotrichum dulcitum je fylogeneticky řazen mezi *Tremellomycetes*. Buňky mají kulovitý až vejcovitý tvar a vyskytují se samostatně nebo v párech. Nepohlavně se rozmnožují tvorbou arthrokonidií, pohlavně se nerozmnožují. Nefermentují, ale pro asimilaci jim vyhovuje většina cukerných substrátů. Majoritním uhlovodíkem buněčných stěn je xylóza. Nejběžnějším místem výskytu je pro *Apiotrichum dulcitum* půda. Biotechnologicky lze využít jejich schopnosti degradovat vysoká množství fenolu i při nízkých teplotách. Jiný průmyslový ani klinický význam nebyl popsán [19].

Apiotrichum (Trichosporon) porosum

Apiotrichum porosum je fylogeneticky řazen mezi *Tremellomycetes*. Buňky mají kulovitý, vejcovitý až prodloužený tvar a vyskytují se samostatně nebo v párech. Tvoří pravé hyfy a pohlavně se nerozmnožují. Nefermentují, ale dobře asimilují cukerné zdroje vyjma inulinu. Buněčné stěny obsahují xylózu. Izován byl nejčastěji z půdy, popřípadě z exsudátů dřevin jako tis apod. Často se také vyskytuje v obydlích pacientů s SHP (summer-type hypersensitivity pneumonitis), a se vznikem této alergické reakce je také spojován. Biotechnologické ani jiné průmyslové využití nebylo popsáno [19].

Aureobasidium pullulans

Aureobasidium pullulans patří mezi askomycety. Na základě odlišností v morfologii a fyziologii jsou popsány tři variety *A. pullulans* var. *pullulans*, var. *malenogenum* a var. *aubasidani*. Všichni tvoří po sedmi dnech kolonie velké v průměru 2-4 mm, které mají růžově-bílou barvu, popřípadě jsou olivově zelené nebo žlutavé. Jsou hladké a slizké. U starších kolonií se mohou objevovat černá místa. *A. pullulans* je celosvětově rozšířený ubikvitní druh, jehož aktivita je závislá na vodě. Nejčastěji bývá izolován z vody, koupelen, jídla nebo krmiv. Biotechnologicky se *A. pullulans* využívá jako producent biodegradabilního extracelulárního polymeru pullulan, který se používá v potravinářství a ve farmacii. Taký je známý jako producent celého spektra hydrolytických enzymů. *A. pullulans* je původcem různých kožních dermatitid [33].

Barnettozyma californica

Rod *Barnettozyma* patří společně s rody *Wickerhamomyces*, *Cyberlindnera* a *Starmera* do velké skupiny *Saccharomycetales*. Buňky mají sférický, prodloužený nebo vejcovitý tvar. Rozmnožují se asexuálně multilaterálním pučením nebo sexuálně tvorbou askospor. Klíčový pro její identifikaci je fakt, že netvoří pseudohyfy, fermentuje pouze glukózu a asimiluje nitráty jako zdroj dusíku [19].

Barnettozyma californica je celosvětově rozšířený druh, nejčastěji byla izolována z půdy (Indie, Austrálie, Nový Zéland, Belgie, USA, Kanada), dále z medvědího a volského trusu, rybníční a říční vody, kolonizuje těla hmyzu a krevet a nachází se také v kalech z čistíren odpadních vod. Biotechnologicky lze tuto kvasinku využít zejména při S-stereospecifické oxidaci racemické směsi sekundárních alkoholů a také při stereospecifické oxidaci mentholu a neo-mentholu. V potravinářství byla prokázána vysoká produkce lipáz těmito kvasinkami, které se podílejí na degradaci kvality olivového oleje, v němž v důsledku této produkce

podstatně narůstá celkový obsah diglyceridů a volných mastných kyselin. Klinicky jsou *Barnettozomy* nevýznamné, protože netolerují teploty vyšší jak 30 °C [19].

Candida odintsovae

Rod *Candida* patří mezi *Saccharomycetales*. Jsou to kvasinky tvořící cylindrické, vejcovité, trojúhelníkovité, slzovité nebo prodloužené buňky. Rozmnožují se nepohlavně holoblastickým pučením, pohlavně se nerozmnožují. Fermentují glukózu, sacharózu a rafinózu. Buněčná stěna obsahuje glukózu a mannózu. Původ izolátů je spojen s mízou bříz popřípadě s nádobím používaným v pivovarnictví. Biotechnologické ani jiné průmyslové využití nebylo popsáno [19].

Candida oleophila

Buňky těchto kvasinek jsou sférické, vejcovité, popřípadě prodloužené, rostou v párech nebo tvoří rozvětvené a nerozvětvené řetízky. Rozmnožují se nepohlavně holoblastickým pučením, pohlavně se nerozmnožují. Fermentují glukózu, částečně galaktózu a maltózu. Buněčná stěna obsahuje glukózu a mannózu. Izoláty pochází nejčastěji z ovocných stromů, ovoce a dalšího rostlinného materiálu, který je spojován s výskytem *Drosophil*. V zemědělství se používá jako biokontrolní látka posklizňových nemocí jádrových a citrusových plodů. Komerčně se tato očkovací látka prodává pod názvem Aspire™ a chrání ovoce před napadením plísní *Penicillium digitatum* [19].

Candida solani

Tento druh kvasinek tvoří vejcovité popřípadě prodloužené buňky, které se vyskytují samostatně, v párech nebo tvoří drobné řetízky. Rozmnožují se nepohlavně holoblastickým pučením, pohlavně se nerozmnožují. Fermentuje pouze glukózu. Buněčná stěna obsahuje glukózu a mannózu. Klíčová pro její identifikaci je asimilace L-sorbózy, L-lysinu a kadaverinu, neasimiluje galaktózu, L-rhamnózu a erythritol. Izoláty jsou spjaty s rostlinným materiálem, nejčastěji jsou to škrobová zrna rajčat, exsudáty dubu nebo piva plzeňského typu. Biotechnologický, průmyslový ani klinický význam nebyl popsán [19].

Clavispora reshetovae

Clavispora reshetovae patří do vývojové větve *Saccharomycetales*. Buňky mají sférický až vejcovitý tvar, vyskytují se jednotlivě, v párech nebo tvoří drobné klastry. Kolonie jsou hladké, matné a krémově bílé. Nepohlavně se rozmnožují multilaterálním pučením, pohlavně se množí konjugací a následnou tvorbou askospor. Netvoří pravé hyfy ani pseudohyfy. Fermentuje glukózu. Neroste při teplotách vyšších jak 30 °C, takže není klinicky významná. Místem nejčastějšího výskytu je půda [34].

Cryptococcus flavescens

Cr. flavescens byl donedávna považován za synonymum *Cr. laurentii*, teprve po úplné analýze buněčných proteinů a sekvenaci rRNA bylo zjištěno, že se jedná o samostatný druh, který náleží do fylogenetické větve *Tremellales*. Buňky těchto kvasinek mají nepravidelný tvar, mohou být oválné, hruškovité nebo cylindrické. Rozmnožují se laterálním nebo polárním pučením. Nejsou schopné fermentace, ale asimilují většinu cukerných zdrojů s výjimkou inulinu. Vyskytuje se běžně ve vzduchu a v půdě, zdroje nálezu jsou ale různé, např. obilky

pšenice a kukuřice, sójová omáčka, nektar bylin, tělo housenek nebo mozkomíšní mok pacientů s AIDS. Z biotechnologického hlediska je zajímavý kmen *Cr. nodaensis* (synonymum *Cr. flavesceus*), který byl patentován jako producent termostabilních glutamináz, odolných vůči vysokým koncentracím solí. *Cr. flavesceus* produkuje kyselé extracelulární polysacharidy, které obsahují D-xylózu, D-mannózu, D-galakturonové kyseliny a O-acetyl. *Cr. flavesceus* je schopný potlačit výskyt plísní *Fusarium* v obilovinách, zvláště u ječmene a pšenice [19].

Cryptococcus musci

Cryptococcus musci patří do vývojové větve *Trichosporonales*. Buňky jsou vejcovité, oválné nebo prodloužené, vyskytující se jednotlivě, v párech nebo tvořící klastry. Rozmnožuje se nepohlavně pučením. Nefermentuje, ale je schopen asimilovat všechny cukerné zdroje a většinu alkoholů s výjimkou methanolu. Je schopen využít kreatin a glukosamin, čímž se odlišuje od ostatních ve své vývojové třídě. Buněčné hydrolyzáty obsahují xylózu. Nálezy pocházejí z mechových porostů v Japonsku a hnilobu bukové dřeviny v Nizozemí, proto je mu přisuzován výskyt v závislosti na rostlinách. Biotechnologický ani klinický význam nebyl popsán [19].

Cyberlindnera misumaiensis

Cyberlindnera misumaiensis nebo též *Lindnera misumaiensis* je kvasinka tvořící sférické, vejcovité nebo prodloužené buňky, které se vyskytují jednotlivě nebo v párech. Rozmnožují se nepohlavně multilaterálním pučením, pohlavně se rozmnožují askosporami. Fermentují glukózu, asimilují glukózu, ethanol, glycerol, mannitol a laktát. Výskyt této kvasinky je spojen převážně s jablky, byla izolována ze samotných plodů, výrobků z nich nebo ze cideru. V těchto výrobcích může být také původcem zkázy [19].

Cyberlindnera saturnus

Cyberlindnera saturnus patří do vývojové větve *Saccharomycetales*, nejprve byla řazena mezi *Williopsis*, následně byla ustanovena jako samostatný druh. Buňky mají elipsoidní, sférický nebo prodloužený tvar, vyskytují se samostatně, v párech nebo tvoří malé klastry. Nepohlavně se rozmnožují multilaterálním pučením, pohlavně tvorbou askospor. Fermentuje glukózu a sacharózu, výjimečně rafinózu. Z cukerných zdrojů nejlépe asimiluje glukózu, sacharózu, rafinózu a cellobiózu. *Cyberlindnera saturnus* je celosvětově rozšířený, běžný druh, který se vyskytuje hlavně v půdách, sladké vodě a v opadaném listí. V biotechnologiích lze využít její schopnosti S-stereoselektivní oxidace racemické směsi sekundárních alkoholů, a také je stereospecifická při oxidaci methanolu a neo-methanolu. Jiný průmyslový nebo klinický význam nebyl popsán [19].

Cyberlindnera suaveolens

Cyberlindnera suaveolens patří do vývojové větve *Saccharomycetales*, nejprve byla řazena mezi *Williopsis*, ale následně byla ustanovena jako samostatný druh. Buňky mají elipsoidní, sférický nebo prodloužený tvar, vyskytují se samostatně, v párech nebo tvoří malé klastry. Nepohlavně se rozmnožují multilaterálním pučením, pohlavně tvorbou askospor. Fermentují glukózu a sacharózu, výjimečně rafinózu. Z cukerných zdrojů nejlépe asimilují glukózu, sacharózu, rafinózu a cellobiózu. Izoláty pocházejí nejčastěji z půdy. Biotechnologický, jiný průmyslový nebo klinický význam nebyl popsán [19].

Cystofilobasidium capitatum

Nejprve bylo *Cys. capitatum* identifikováno jako *Rhodosporidium capitatum*, ale na základě absence septa v basidiích bylo překlasifikováno na samostatný rod *Cystofilobasidium*. Buňky, které vytváří, mají kulovitý nebo vejcovitý tvar a vyskytují se samostatně nebo v párech. Kolonie jsou oranžovo-růžově zbarvené, ale je prokázána i existence nepigmentovaných druhů. Nepohlavně se rozmnožují polárním pučením, pohlavně pak tvorbou teliospor. Druh *Cys. capitatum* zahrnuje pouze kmeny, které jsou schopny samooplození. Jsou nefermentující, ale asimilují většinu cukrů s výjimkou inulinu, melibiózy a methylglukosidů. Buněčné stěny obsahují glukózu, mannózu a xylózu. Izoláty byly získány z různých prostředí, nejčastěji jsou spojovány s výskytem rostlin a řas. Pochází např. ze zooplanktonu Antarktického oceánu, z těla černých racků, z rostlinných materiálů, z říční, jezerní a povrchové mořské vody, z hub, z listů jetele napadených rzí, z půdy opadavých i jehličnatých lesů nebo z nektaru rostlin. *Cys. capitatum* exhibuje i při teplotě nižší než 5 °C pektolytickou aktivitu, jiný biotechnologický nebo klinický význam nebyl popsán [19].

Cystofilobasidium infirmominiatum

Cys. infirmominiatum vytváří kulovité nebo vejcovité buňky, které se vyskytují samostatně nebo v krátkých řetízích, kolonie mají růžovou barvu. Pohlavní rozmnožování se děje tvorbou teliospor, patří mezi heterothalní druhy. Buněčná stěna obsahuje převážně glukózu, v menším množství mannózu a xylózu. Nejsou schopni fermentace, ale asimilují téměř všechny cukerné zdroje s výjimkou inulinu, melibiózy a methylglukosidů. Zástupci druhu *Cys. infirmominiatum* jsou adaptováni na prostředí s nízkými teplotami, o čemž svědčí i původ izolátů. Byli izolováni z povrchových i hlubkových vod Antarktického oceánu, ze zooplanktonu, z ústí řek, ze vzduchu, z mražené a chlazené zeleniny a ze stromů. Biotechnologický, klinický ani jiný průmyslový význam nebyl popsán [19].

Cystofilobasidium macerans

Cys. macerans tvoří elipsoidní nebo vejcovité buňky, které se vyskytují jednotlivě nebo v párech. Kolonie mají korálově červenou až broskvově růžovou barvu. Nepohlavní rozmnožování probíhá polárním pučením. Pohlavní rozmnožování se děje tvorbou teliospor, kmeny jsou schopné samooplození i heterothalní. Buněčné hydrolyzáty obsahují xylózu a mannózu. *Cys. macerans* nefermentují a neasimilují inulin, melibiózu, methylglukosidy a škrob. Někteří zástupci byli izolováni z vodního prostředí, nejčastěji z ústí řek, z jezer nebo z rosy smáčící len. Další izoláty jsou spjaté se živočichy, byly získány z těla sarančete nebo z tlamy novorozeného jelena. Izoláty pochází také z rostlin, z listů obilovin nebo z květů. Některé kmeny jsou dobře adaptovány na nízké teploty a byly izolovány z ledovců nebo z vody tajících ledovců. Z biotechnologického hlediska je *Cys. macerans* významným producentem polygalakturonáz, pektinyláz, pektátlyáz a pektinesteráz. V zemědělství se využívá k zádrži lnu při jeho jednocení od plevle. V roce 1997 byl *Cys. macerans* označován za původce meningoencefalitidy. Vzhledem k tomu, že nebyla prokázána jeho životaschopnost při teplotách nad 37 °C, mu skutečný klinický význam nelze přisuzovat [19].

Debaryomyces hansenii

Klasifikace *Debaryomyces* nebyla vždy jednoznačná, dnes jsou ale řazeny do vývojové větve *Saccharomycetales*. Buňky, které tvoří, jsou sférické nebo vejcovité a vyskytují se jednotlivě, v párech nebo tvoří krátké řetězce. Nepohlavně se rozmnožují multilaterálním pučením, pohlavně tvorbou askospor. Částečně jsou tyto kvasinky schopné fermentace glukózy, galaktózy, sacharózy, maltózy, rafinózy a trehalózy. Dobře asimilují převážnou většinu cukerných zdrojů i alkoholů. *Debaryomyces hansenii* jsou v přírodě velice rozšířené a jsou často izolovány z půd, z rostlin, z lososů, z fermentovaných sójových produktů, ze sýrů a dalších mléčných výrobků. Někteří zástupci byli izolováni ze zanícených lidských tkání. Kromě jejich častého výskytu v potravinářství nebyl popsán žádný jiný biotechnologický nebo průmyslový význam [19].

Galactomyces candidum

Galactomyces patří do vývojové větve *Saccharomycetales*. Jejich kolonie vytváří bílý, hladký, suchý, vláskovitý povlak. Pohlavně se rozmnožují tvorbou askospor. Jsou schopny omezené fermentace glukózy. Asimilují glukózu, galaktózu a některé alkoholy. Buněčné hydrolyzáty obsahují glukózu, mannózu a galaktózu. Tyto kvasinky jsou celosvětově rozšířené, spjaté s vlhkými substráty, ovocem nebo rajčaty, kde jsou původcem hniloby. V nutričně bohatých substrátech jako je siláž nebo mléčné produkty žijí jako saprofyté. Zástupci byli nalezeni také v dýchacím a trávicím ústrojí lidí a zvířat. Z biotechnologického hlediska je významná produkce lipáz některými kmeny. V potravinářském průmyslu se *Galactomyces candidum* využívá při zrání sýrů a tvorbě aromat. Zároveň je příčinou před i posklizňové hniloby ovoce. V lékařství je *Galactomyces candidum* označován jako patogen (BioSafetyLevel 1), s nímž je s ohledem na technologické využití spjaté riziko infekce v případě konzumace [19].

Galactomyces geotrichum

Dříve bylo *Galactomyces geotrichum* považováno za anamorfní k *Galactomyces candidum*, později bylo na základě analýzy DNA ustanoveno jako samostatný druh. Buňky vytváří bílé, suché, hladké kolonie, které mohou vonět po ovoci. Rozmnožují se pohlavně tvorbou askospor. Z cukerných zdrojů dobře asimilují glukózu a galaktózu. Buněčné hydrolyzáty obsahují glukózu, mannózu a galaktózu. Převážná většina izolátů pochází z půdy, kde podporují růst travin. Přes nízkou virulenci je *G. geotrichum* patogenní pro rajčata a citrony. Klinický ani biotechnologický význam nebyl popsán [19].

Galactomyces pseudocandidus

G. pseudocandidus bylo od *G. candidum* rozeznáno na základě analýzy DNA. Buňky vytváří bílé, suché, hladké kolonie, které mohou vonět po ovoci. Rozmnožují se pohlavně tvorbou askospor. Z cukerných zdrojů dobře asimilují glukózu a galaktózu. Izoláty pocházejí nejčastěji z půdy nebo z dřevin, ale *G. pseudocandidus* byl izolován i z papíroviny, ze žaludku vlka, z kalových filtrů nebo z řepy. Biotechnologický ani jiný průmyslový význam nebyl popsán, stejně jako klinický význam, a to vzhledem k absenci růstu při 37 °C [19].

Goffeauzyma gastrica (Cryptococcus gastricus)

Goffeauzyma gastrica patří do vývojové větve *Filobasidiales* a tvoří téměř výhradně buňky kulovitého tvaru, které se vyskytují jednotlivě. Nejsou schopné fermentace. Buněčné hydrolyzáty obsahují glukózu, mannózu a xylózu. *Goffeauzyma gastrica* se nejčastěji vyskytuje v půdách chladných oblastí, pět typových kmenů bylo izolováno z lesní půdy v Rakousku, další nálezy pochází i z oblastí věčného ledu. *Goffeauzyma gastrica* také běžně kolonizuje gastrointestinální trakt savců, izolován byl z bachoru pižmoňů a z výplachu žaludku pacienta trpícího tuberkulózou. S ohledem na jeho teplotní optimum menší než 30 °C není jeho klinický význam pro člověka prokázán. Nebylo popsáno ani potenciální biotechnologické či zemědělské využití tohoto druhu [19].

Hanseniaspora uvarum

Hanseniaspora uvarum byla zařazena do vývojové větve *Saccharomycetales*, je anamorfní s druhem *Klockera appiculata*. Vytváří sférické až vejcovité nebo prodloužené buňky, které se vyskytují samostatně nebo v párech. Pohlavně se rozmnožuje tvorbou askospor, nepohlavně bipolárním pučením. Fermentuje pouze glukózu, asimiluje glukózu, cellobiózu a salicin. Tato kvasinka je rozšířená, běžně bývá izolována z půdy, hmyzu, ovoce nebo moštů. Studie ukázaly, že *Hanseniaspora uvarum* je vůbec nejčastěji se vyskytující kvasinka na čerstvém ovoci, kde ale napomáhá jeho zkáze. Další nálezy pocházejí z mořských a sladkých vod nebo z klinických vzorků. *Hanseniaspora uvarum* slouží jako potrava pro *Drosophily*. Biotechnologický význam spočívá v produkci β -D-glukosidázy a β -D-xylosidázy, které se uplatňují při výrobě vína. V potravinářském průmyslu se využívá v iniciační fázi přírodního kvašení ovocných šťáv, nejčastěji grepových a pomerančových. Další nálezy jsou běžné při hvozdní sladu nebo při zpracování kávových zrn fermentací. *Hanseniaspora uvarum* se využívá jako biokontrolor pěstování vinných hroznů, kdy svojí přítomností inhibuje růst plísní *Botrytis cinerea* a *Aspergillus ochraceus* a tvorbu mykotoxinů. *Hanseniaspora uvarum* není považována za významný lidský patogen, přestože existují klinické nálezy ze stolice, zanícených nehtů nebo krku. Tyto infekce jsou raritní a jsou spojovány s konzumací syrových ryb a krevet [19].

Holtermanniella (Cryptococcus) takashimae

Holtermanniella takashimae patří do třídy *Tremellomycetes*. Všechny kmeny tohoto druhu jsou anamorfní. Buňky jsou oválné až prodloužené. Tvoří pastovité růžové kolonie. Nefermentuje. Je celosvětově rozšířená, často izolována z půdy, rostlin, ovoce, dřeva nebo vody. S ohledem na místo výskytu se předpokládá vysoká produkce amyláz, xylanáz a celuláz, které umožňují degradaci rostlinného materiálu. Dobře roste při teplotě 4 °C, takže není klinicky významná [35].

Issatchenkia terricola

Issatchenkia terricola nebo též *Pichia terricola* tvoří kulovité nebo vejcovité buňky, které se vyskytují jednotlivě nebo v párech. Rozmnožují se nepohlavně multilaterálním pučením a pohlavně tvorbou askospor. Fermentovat a asimilovat jsou schopné pouze glukózu. *Issatchenkia terricola* nejčastěji osidluje půdu, ovoce nebo vodu. Byla izolována z různých typů půd po celém světě, z třešní, fiků, vína, kalů nebo mořské vody. Biotechnologický, průmyslový ani klinický význam nebyl popsán [19].

Leucosporidium scottii

Leucosporidia patří do třídy *Microbotrymycetes*. Buňky jsou vejcovitého tvaru a vyskytují se jednotlivě nebo v párech. Buněčné stěny obsahují glukózu, mannózu a galaktózu. Nepohlavně se rozmnožují polárním pučením, pohlavně tvorbou teliospor. Nefermentují, dobře asimilují většinu cukerných substrátů, s výjimkou inulinu, melibiózy a škrobu. *Leucosporidium scottii* je poměrně rozšířená, a jako psychrofilní kvasinka obývá různá prostředí chladného a mírného podnebného pásma. Její izoláty nejčastěji pocházejí z lesní půdy, tlejícího listí nebo kalné říční vody. Osidluje ale i mořské vody, mech nebo solná jezera na Antarktidě, také byla izolována z mraženého hovězího masa. Biotechnologický, průmyslový ani klinický význam nebyl popsán [19].

Metschnikowia pulcherrima

Metschnikowia pulcherrima patří do vývojové větve *Saccharomycetales*. Buňky mají kulovitý nebo elipsoidní tvar a vyskytují se samostatně. Nepohlavně se rozmnožují multilaterálním pučením, pohlavně se rozmnožují prostřednictvím askospor. Fermentuje glukózu, dobře asimiluje cukerné zdroje, s výjimkou inulinu, rafinózy, laktózy, melibiózy a škrobu. Buněčná stěna obsahuje mannózu a glukózu. *Metschnikowia pulcherrima* se vyskytuje v nutričně bohatých částech rostlin, jako jsou květy nebo plody, kde dochází také do styku s hmyzem. Byla izolována z třešní, bříz, vrb a stromových exsudátů. Významné využití nachází v zemědělství, kde se používá jako inhibitor plísní (*Penicillium*, *Botrytis*), kvasinek a bakterií, které napadají hroznové víno a také jako biokontrolor hniloby jablek. *Metschnikowia pulcherrima* je oportunistický lidský patogen, který je spjat se zánětlivými stavy těla. Izolována byla např. z katetru pacientů, kteří po chirurgickém zákroku propadali horečnatým stavům [19].

Meyerozyma guilliermondii

Meyerozyma guilliermondii patří do vývojové větve *Saccharomycetales*, dříve byla označována jako *Pichia guilliermondii* a je anamorfní s druhem *Candida guilliermondii*. Buňky, které tvoří, mají vejcovitý nebo prodloužený tvar a vyskytují se samostatně, v párech nebo tvoří drobné řetízky. Nepohlavně se rozmnožuje multilaterálním pučením, pohlavně se množí tvorbou askospor. Fermentuje glukózu, sacharózu, rafinózu a trehalózu. Dobře asimiluje téměř všechny cukerné zdroje, kromě laktózy a škrobu. Tato kvasinka je celosvětově rozšířená, kolonizuje nejčastěji těla hmyzu, květiny, ovoce a další potraviny. *Meyerozyma guilliermondii* je oportunistický lidský a zvířecí patogen, způsobuje infekce pokožky, měkkých tkání a krevního řečiště. Klinické izoláty pocházejí z krve, hlenu, vředů apod. V biotechnologiích se komerčně využívá její schopnosti tvorby vitamínu riboflavin, který je součástí doplňků stravy jak lidí, tak zvířat. Dále je významná produkce xylitolu, který se používá např. při výrobě žvýkaček [19].

Moniliella oedocephalis

Tyto kvasinky žijí ve sliznatých, lehce vroubkovaných koloniích, které mají zpočátku bílou a později hnědou barvu. Rozmnožují se pouze nepohlavně, pučením. Fermentuje glukózu, galaktózu, sacharózu a maltózu. Buněčná stěna obsahuje glukózu, mannózu a galaktózu. Výskyt těchto kvasinek je zaznamenán výhradně ve spojitosti s plody a larvami medonosných

včel. Biotechnologický význam spočívá v produkci erythritolu, který se komerčně prodává jako nízkokalorické sladidlo. Z klinického hlediska nejsou významné [19].

Naganishia (Cryptococcus) friedmannii

Naganishia friedmannii patří do vývojové větve *Filobasidiales* a tvoří téměř výhradně buňky kulovitěho tvaru, které se vyskytují jednotlivě. Není schopna fermentace. *Naganishia friedmannii* patří k antarktickým druhům, jeho nálezy pocházejí z oblastí věčného ledu na Islandu, v Rusku a USA (Colorado, Aljaška aj.). *Naganishia friedmannii* je schopna růst na chudých médiích bez přidaných vitamínů a je odolná vůči nízkým teplotám. Biotechnologické využití, stejně jako praktický význam v zemědělství a potravinářství, nebylo popsáno. Nejsou známy ani nálezy pocházející z klinických vzorků [19].

Papiliotrema (Cryptococcus) terrestris

Papiliotrema terrestris je blízce příbuzný s *Cr. flavescens*, za kterého byl původně i označován. Buňky mají kulovitý nebo vejcovitý tvar a vyskytují se jednotlivě nebo v párech. Kolonie jsou hladké, máslovité, lesklé s krémovou barvou a neporušeným okrajem. Netvoří pseudomycélia ani pravá mycélia. Nepohlavně se rozmnožuje polárním pučením, pohlavně se nerozmnožuje. Nefermentuje, dobře asimiluje škrob, sacharózu, trehalózu, sukcinát, Tween 20, Tween 80 a xylózu. Vyskytuje se převážně v půdě. Roste při 30 °C, ale ne při 37 °C, takže není klinicky významný. Biotechnologické ani jiné průmyslové využití nebylo popsáno [36].

Pichia kluyveri

Druh *Pichia kluyveri* patří do vývojové větve *Saccharomycetales*. Buňky mají vejcovitý nebo prodloužený tvar a vyskytují se samostatně, v párech nebo tvoří krátké řetízky. Rozmnožují se nepohlavně multilaterálním pučením a pohlavně tvorbou askospor. Fermentovat a asimilovat jsou schopné pouze glukózu. *Pichia kluyveri* je v přírodě široce rozšířená, vyskytuje se nejčastěji na hnilém ovoci nebo na masitých částech rostlin. V zemědělství je její výskyt běžný při fermentaci kávových zrn. Z biotechnologického hlediska je zajímavá schopnost produkce pektin degradujících enzymů. Klinický význam nebyl dosud popsán [19].

Pichia manshurica

Pichia manshurica byla kvůli podobnosti původně označována jako *Pichia membranifaciens*, později byla vyčleněna jako samostatný druh patřící do vývojové větve *Saccharomycetales*. Buňky mají vejcovitý nebo cylindrický tvar a vyskytují se samostatně, v párech nebo tvoří krátké drobné klustry. Rozmnožuje se nepohlavně multilaterálním pučením a pohlavně tvorbou askospor. Nefermentuje, asimiluje pouze glukózu, popřípadě ethanol. Výskyt *Pichia manshurica* je běžný, spjatý s kvašením a hnilobou přírodních materiálů. Typové kmeny byly izolovány z lidských výkalů, proto lze předpokládat možnost infekce těmito kvasinkami. Biotechnologický ani potravinářský význam nebyl popsán [19].

Rhodotorula glutinis

Rhodotorula glutinis je ubikvitní, široce zastoupený druh kvasinek, pro který je charakteristická tvorba růžově pigmentovaných kolonií. Buňky mají kulovitý, vejcovitý až sférický tvar. Rozmnožuje se nepohlavně multilaterálním nebo polárním pučením. Nefermentuje, ale dobře asimiluje většinu cukerných zdrojů. Izoláty pocházejí nejčastěji

z ovoce, ze vzduchu nebo z mořské vody. V zemědělství je její výskyt spojován s rychlejším a intenzivnějším červenáním dozrávajících jablek. *Rhodotorula glutinis* a další druhy *Rhodotorula* jsou používány také jako posklizňové biokontrolory jablek, hrušek a třešní, které chrání před napadením plísněmi. *Rhodotorula glutinis* potenciálně může infikovat lidské tkáně, byla izolována v případech plísňové keratitidy, meningitidy, zánětu oční rohovky, zánětu krve a dalších. Z biotechnologického hlediska je významná produkce karotenoidů těmito kvasinkami [19].

Rhodotorula ingeniosa

Rhodotorula ingeniosa tvoří vejcovité až cylindrické buňky, které se vyskytují jednotlivě nebo v párech. Rozmnožuje se především polárním pučením. Může produkovat extracelulární kapsuli. Buněčné hydrolyzáty obsahují převážně mannózu a fukózu. Nefermentují, ale dobře asimilují většinu cukerných zdrojů. *Rhodotorula ingeniosa* je celosvětově rozšířená, nejčastěji byla izolována z rostlinných materiálů, z trávy, z listů, ale také z půdy, potravin nebo z vody. Biotechnologický ani jiný průmyslový význam není znám. Její bližší charakterizaci výrazně komplikuje její podobnost s *Rhodotorula vanilica* [19].

Rhodotorula pustula

Rhodotorula pustula, dříve označovaná také jako *Candida pustula*, patří mezi *Mikrotryomycety*. Její nejbližší příbuznou je *Rhodotorula buffonii*, od níž ji lze jen těžko odlišit. Tvoří vejčité nebo elipsoidní buňky, které se vyskytují jednotlivě nebo v párech. Rozmnožuje se nepohlavně polárním pučením. Nefermentuje, dobře asimiluje především glukózu, ale také trehalózu, celobiózu nebo xylózu. Buněčné hydrolyzáty obsahují mannózu, rhamnózu a fukózu. Její izoláty pochází ve všech případech z černého rybízu, ale nebylo prokázáno, že by výskyt této kvasinky přímo závisel na dané rostlině. Biotechnologický, jiný průmyslový ani klinický význam nebyl zaznamenán [19].

Rhodotorula vanilica

Rhodotorula vanilica je blízce příbuzná *Rh. ingeniosa*, odlišit je lze na základě sekvence genů D1/D2 domény, popřípadě testy na utilizaci nebo růst. Oba druhy spadají do třídy *Curvibasidium*. Buňky mají kulovitý až vejcovitý tvar, vyskytují se jednotlivě nebo v párech. Mohou si vytvářet ochrannou kapsuli. Rozmnožují se nepohlavně polárním pučením. Nefermentují, ale dobře rostou na většině cukerných zdrojů. *Rhodotorula vanilica* byla izolována ze stojatých vod nebo povrchu rostlin. Biotechnologický, jiný průmyslový ani klinický význam nebyl popsán [19].

Saccharomyces cerevisiae

Saccharomyces cerevisiae je hojně početně zastoupený druh kvasinek patřící mezi *Saccharomycetales*. Buňky mají kulovitý, vejcovitý nebo prodloužený tvar a vyskytují se jednotlivě nebo tvoří drobné klustry. Rozmnožují se nepohlavně multilaterálním pučením, pohlavně se rozmnožují konjugací a následnou tvorbou askospor. Fermentuje glukózu, sacharózu, maltózu a rafinózu. Stejně tak dobře asimiluje glukózu, sacharózu, maltózu, rafinózu, trehalózu a ethanol. Buněčné stěny obsahují majoritně mannózu a glukózu. *Saccharomyces cerevisiae*, přes své obrovské rozšíření, nebývá příliš často izolována z přírody. Její výskyt je spjat s lehkou dostupnými cukernými zdroji, proto je nejčastěji nacházena na ovoci

nebo jiných rostlinných částech. Další izoláty pocházejí z průmyslu – pivovarského, pekařského, vinařského a z alkoholového, kde má *S. cerevisiae* nesporné biotechnologické využití. Biotechnologicky je také využívána produkce heterologních proteinů, používá se jako biokatalyzátor přírodních transformací a v odpadovém hospodářství. *S. cerevisiae* je modelovým mikroorganismem v biologii a její genom byl první kompletně sekvenovanou eukaryotou. Z klinického hlediska může být *S. cerevisiae* lidem nebezpečná, ale i přesto, že byla izolována ze sliznic imunosupresivních pacientů, není stále zařazena na seznam lidských patogenů [19].

Saccharomycopsis crataegensis

Saccharomycopsis crataegensis patří mezi *Saccharomycetales*. Buňky jsou elipsoidní nebo prodloužené, na jednom konci zpravidla zúžené. Vyskytují se jednotlivě a často tvoří pravá mycélia. Nepohlavně se rozmnožuje multilaterálním pučením, pohlavně tvorbou askospor. Jsou schopné fermentovat glukózu, dobře asimilují glukózu, xylózu, sorbózu a ribózu. Izolována byla z ovoce, z ananasu nebo jablek a také ze samotných stromů. Průmyslový ani klinický význam nebyl popsán. Z biotechnologického hlediska mohou být zajímavé lineární molekuly DNA plasmidu a dvoušroubovicové molekuly RNA, které tyto buňky tvoří [19].

Saitozyma podzolica (Cryptococcus podzolicus)

Saitozyma podzolica náleží do fylogenetické větve *Tremellales*. Buňky jsou elipsoidní, cylindrické nebo prodloužené. Rozmnožují se nepohlavně polárním nebo podélným pučením, mohou tvořit filamenta, která při delší kultivaci přechází v hyfy. Nefermentují, ale jsou schopny asimilovat všechny cukerné zdroje s výjimkou inulinu. Produkují extracelulární polysacharidy obsahující glukózu, mannózu, galaktózu a xylózu. Na rozdíl od ostatních *Tremellales* je *Saitozyma podzolica* schopna využít aromatické sloučeniny jako galát nebo katechol. Izoláty nejčastěji pocházejí z půdy ve východní Evropě; z dubových a borových lesů, podzolových půd, rašelinišť, červených lesních půd, hnědých lesních půd a šedých lesních půd. Nálezy ale pochází i z tropických deštných lesů, travnatých ploch v Anglii nebo zemědělských půd v USA. Lze říci, že *Saitozyma podzolica* se vyskytuje napříč klimatickými zónami většinou v závislosti na daném typu půd. Biotechnologické využití našly jím produkované epoxidázy, které přednostně hydrolizují 2,2 - disubstituované epoxidy a mohou tak sloužit při syntéze enantiomerních epoxidů. *Saitozyma podzolica* je s velkým výtěžkem schopna produkovat β -xylosidázy. Je tolerantní vůči kontaminaci mědí a roste na většině polysacharidů. Klinický význam ani využití v potravinářství nebylo popsáno [19].

Schwanniomyces capriotti

Schwanniomyces capriotti patří mezi *Saccharomycetales*, sesterským rodem jsou *Debaryomycety*. Buňky, které tvoří, jsou sférické až vejcovité a vyskytují se samostatně nebo v párech. Nepohlavně se rozmnožují multilaterálním pučením, pohlavně tvorbou askospor. Fermentují glukózu, sacharózu a rafinózu, dobře asimilují téměř všechny cukerné zdroje. Typickým životním prostředím je pro *Schwanniomyces capriotti* půda. Biotechnologický, průmyslový ani klinický význam nebyl popsán [19].

Sporidiobolus metaroseus

Pro tyto kvasinky jsou typické oranžové až lososově červené kolonie s elipsoidními nebo cylindrickými buňkami. Buňky se vyskytují jednotlivě a rozmnožují se nepohlavně polárním pučením. Výjimečně tvoří hyfy a pseudohyfy. Nepohlavním stádiem je *Sporobolomyces roseus*. Nefermentují, dobře asimilují většinu cukerných zdrojů. *Sporidiobolus metaroseus* je velmi rozšířený druh, nejčastěji se nachází na rostlinách, v půdě, ve vzduchu nebo v mořské vodě. Biotechnologicky významné jsou tyto kvasinky izolované z listů, protože produkují enzymatický aparát schopný přeměny lignocelulózového odpadu na technický lignin. *Sporobolomyces roseus* produkují karotenoidy a některé psychrofilní kmeny rozkládají netěkavé aromatické látky. Tyto kvasinky nejsou patogenní, přesto, že byly izolovány ze zaníceného chodidla nebo houbových infekcí. Některé kmeny produkují antibakteriální látky, které jsou schopny inhibovat růst *Pseudomonád* a *Stafylokoků* [19].

Tausonia (Trichosporon) pullulans

Tausonia pullulans, označovaná také jako *Guehomyces pullulans*, patří do třídy *Tremellomycetes*, vývojové větve *Cystofilobasidiales*. Tvar buňky je kulatý až vejcovitý a buňky se vyskytují jednotlivě nebo v párech. Kolonie vytváří drsnou, matnou pelikulu. Nepohlavně se rozmnožuje pučením, tvoří pravé hyfy a arthrokonidie, pohlavně se nerozmnožují. Nefermentují, dobře asimilují cukerné zdroje vyjma inulinu. Buněčné hydrolyzáty jsou bohaté na glukózu, mannózu, xylózu a glukosamin. *Tausonia pullulans* se vyskytuje v různých životních prostředích. Byl izolován z půdy, rostlin, holubího trusu, infekčních koček, z pilin, z mraženého hovězího masa, z másla, pivovarských potrubí, z mízy javoru a kaštanu nebo ze vzduchu, zejména v Evropě. Biotechnologické aplikace tohoto druhu spočívají ve využití jeho enzymatického aparátu pro degradaci průmyslového odpadu, zejména z ropného průmyslu. *Tausonia pullulans* je schopna hydroxylovat xenobiotika jako dibenzofuran, přeměňovat těžko rozložitelný lignin, hydrolyzovat laktózu v mléce, protože produkuje β -galaktosidázy, a to i při teplotách okolo 0 °C. V zemědělství se používá jako biokontrolor, který eliminuje vznik posklizňových hnilob broskví a také je spojován s hnilobou rajčat. Z klinického hlediska je význam *Tausonia pullulans* spekulativní, protože je to psychrofilní kvasinka s teplotním optimem menším než 25 °C, tudíž se nepředpokládá jeho výskyt při teplotě lidského těla, ale zároveň byl v několika studiích označen jako oportunistický lidský patogen s vysokou úmrtností pacientů. Byl izolován u pacientů s neutropenií, granulomatózní nemocí krve nebo z infekcí onkologických pacientů. Lze tedy říci, že jako s život ohrožujícím patogenem, se s *Tausonia pullulans* zatím setkáváme jen v případech imunosupresivních jedinců, ale třeba k němu přistupovat s náležitou obezřetností [19].

Trichosporon akiyoshidainum

Taxonomické postavení *Tr. akiyoshidainum* je stále nejasné. Často bývá kvůli nejednoznačné identifikaci označován jako *Tr. gracile* nebo *Tr. brassicae*. Buňky jsou kulovité, elipsoidní nebo cylindrické, vyskytují se jednotlivě nebo v párech. Nefermentuje, dobře asimiluje glukózu, popřípadě alkoholy. Buněčné hydrolyzáty obsahují hlavně xylózu. Vyskytuje se na potravinách, byl izolován z masných výrobků, sýrů, jogurtů nebo hlávkového zelí. *Tr. brassicae* se v biotechnologiích používá jako biosenzor pro detekci těkavých látek,

např. ethylalkoholu nebo kyseliny octové. *Tr. brassicae* produkuje esterázy, které lze použít pro hydrolýzu ketoprofenethylesterů. Další vlastnosti ani význam nebyly popsány [19].

Trichosporon asahii

Trichosporon asahii je fylogeneticky řazen mezi *Tremellomycetes*. Tvoří bílé kolonie, buňky mají kulatý až vejcovitý tvar a vyskytují se jednotlivě nebo v párech. Nepohlavně se rozmnožují tvorbou arthrokonidií, pohlavně se nerozmnožují. Nefermentují, ale pro asimilaci jim vyhovuje většina cukerných substrátů. Majoritním uhlovodíkem buněčných stěn je xylóza, na základě čehož byl rod *Trichosporon* oddělen od rodu *Geotrichum*, pro který je typický galaktomannan. *Trichosporon asahii* je široce rozšířeným druhem, většina izolátů je klinických. Způsobuje infekční onemocnění trichosporonóza, které u imunodeficientních pacientů mohou být i život ohrožující. Byl izolován z krve, plic, močového měchýře, z pokožky, nehtů a také z obydlí postihnutých pacientů. Léčba je komplikovaná, protože dosud nebyl popsán způsob virulence a *Tr. asahii* je rezistentní k amphotericinu B. Při opakované inhalaci arthrokonidií může dojít k alergické reakci, která se označuje jako SHP (summer-type hypersensitivity pneumonitis). Biotechnologické využití této kvasinky spočívá právě ve výzkumu možností léčby SHP [19].

Trichosporon cutaneum

Trichosporon cutaneum je fylogeneticky řazen mezi *Tremellomycetes*. Buňky mají kulovitý, cylindrický až prodloužený tvar a vyskytují se samostatně nebo v párech. Nepohlavně se rozmnožují tvorbou arthrokonidií, pohlavně se nerozmnožují. Nefermentují, ale pro asimilaci jim vyhovuje většina cukerných substrátů. Majoritním uhlovodíkem buněčných stěn je xylóza. *Tr. cutaneum* je v životním prostředí široce rozšířený, jeho izoláty ale pocházejí také z lidí nebo zvířat. Nejčastěji bývá nalezen v mléce nebo v sýrech, v kloakách tažných ptáků, v jehličnatých i opadavých lesích Slovenska a v aktivovaném kalu. V biotechnologiích se *Tr. cutaneum* využívá jako mezifázový bioreaktor pro enantioselektivní degradaci nesteroidních léků tišících zánět, jako je ibuprofen. V potravinářství tvoří hlavní podíl mykobioty v mléce. Jako patogenní pro člověka nebyl prokázán, izoláty z lidských tkání jsou výjimečné a často pocházejí z hlubokých zánětů [19].

***Trichosporon laibachii* (*multisporum*)**

Trichosporon laibachii je označován také jako *Tr. multisporum*. Tyto dva druhy mají identické ITS sekvence i počet G-C bází a DNA-DNA hybridizace je totožná ze 72 %. Sedm odchylek bylo nalezeno při analýze D1/D2 domény rRNA, proto je jeho taxonomické zařazení stále předmětem výzkumu. Buňky jsou kulovité nebo vejcovité. Tvoří přepažené hyfy s kulovitými konidiemi a arthrokonidiemi. Nefermentují, dobře asimilují cukerné zdroje vyjma inulinu. Buněčné hydrolyzáty obsahují především xylózu. Nejvíce rozšířené jsou v půdě nebo se vyskytují ve zvířecích výkalech, byl izolován např. z krysího nebo netopýřího trusu. Biotechnologické, jiné průmyslové ani klinické využití nebylo popsáno [19].

Torulaspora delbrueckii

Torulaspora delbrueckii patří do vývojové větve *Saccharomycetales*. Buňky jsou kulovité nebo sférické a vyskytují se zpravidla jednotlivě, výjimečně v párech. Rozmnožují se nepohlavně multilaterálním pučením nebo pohlavně tvorbou askospor. Fermentují a asimilují

hlavně glukózu a výjimečně i další sacharidy. *Torulaspora delbrueckii* je velmi rozšířený druh, který bývá nejčastěji izolován z půdy, fermentovaných ovocných nápojů, džusů, čajů, pív, mléka nebo kůry stromů. Biotechnologický potenciál této kvasinky spočívá v možnostech jejího využití v pekařství a vinařství. Směs kvasinek *Torulaspora delbrueckii* a *Saccharomyces cerevisiae* použitá při výrobě sladkých vín zlepšuje výsledný flavour nápoje. V pekařství by *Torulaspora delbrueckii* našla uplatnění při výrobě mražených chlebových těst, protože tyto kvasinky jsou mnohem odolnější vůči mrazu než *S. cerevisiae*. Zatímco *S. cerevisiae* již po 14 dnech mražení sníží životaschopnost o 80 %, *Torulaspora delbrueckii* je i po 4 měsících schopna kynutí těsta. *Torulaspora delbrueckii* je také příčinou zkázy ovoce, ovocných nápojů, zeleninových a masných salátů, mléčných výrobků a sýrů. Je ale citlivá vůči konzervantům. Klinický význam je minoritní, její anamorfové byli izolováni z kožní léze a infekce srdeční chlopně [19].

2.4.3 Biotechnologické využití kvasinek

Kvasinky hrají v oblasti ekonomie i zdravotnictví důležitou roli. Pro to, abychom kvasinky mohli biotechnologicky využívat, je nutné, abychom znali zákonitosti jejich života. Musíme porozumět tomu, čím se živí, jaký je jejich metabolismus, co jej ovlivňuje, jak rostou, jak se rozmnožují a čím je způsobena samotná buněčná smrt [13].

První průmyslové využití kvasinek bylo pravděpodobně při vaření piva a kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* jsou tak považovány za první „domestikovaný“ mikroorganismus. Schopnost fermentace využíváme pro kvasné procesy při výrobě piva, vína, lihových nápojů a bioethanolu. V potravinářství se kvasinky používají i za účelem produkce ochucovadel, enzymů, barviv a dalších aditiv a také je využíváme jako pekařské droždí. V průmyslu dnes již mají ale i mnoho jiných využití. Kvasinky, mnohdy geneticky modifikované, jsou využívány ve farmaceutickém průmyslu pro produkci léčiv, vakcín, probiotik, hormonů a krevních faktorů. V environmentálních technologiích se kvasinky stávají prostředkem pro bioremediaci, likvidaci odpadů, sorpci kovů a také se používají pro ochranu sklizně. Dále slouží kvasinky jako modelové organismy v buněčné a molekulární biologii a v biochemii. V neposlední řadě jsou využívány při klinickém výzkumu genotoxicity, léčby rakoviny a AIDS. Půdní kvasinky pak hrají nezastupitelnou úlohu při koloběhu živin v přírodě, jsou důležitými destruenty a udržují biodiverzitu v rovnováze [13].

2.4.4 Význam půdních kvasinek v přírodě

Ač není přesně známo jak, půdní biota přímo ovlivňuje funkci půdy. Zaprvé se kvasinky podílejí na udržení půdní kapacity vodní zadržky a agregací půdních částic brání její erozi [18, 21]. Zadruhé jsou kvasinky antagonisty mnohých patogenů, takže se podílí na hygienizaci půdy a udržují půdní biodiverzitu v rovnováze [23]. V neposlední řadě se podílejí na dekompozici, koloběhu biogenních prvků v přírodě a udržení půdního systému s dostatkem živin [18, 21].

Význam půdních kvasinek tedy spočívá především v jejich schopnosti transformace živin. Udává se, že v půdě končí 50-90 % nadzemní biomasy a všechna biomasa podzemní. Půda tedy představuje obrovské množství tekoucí energie, kde se organické substráty syntetizují i rozkládají zároveň [37]. Kvasinky nejsou primárními destruenty organického odpadu, ale jsou to destruenti meziproduktů rozkladu organického materiálu, který započal hmyz a korýši [17, 37]. Výjimkou jsou v tomto případě pigmentované černé kvasinky, např. *Aureobasidium* nebo

Coniosporium, které mají schopnost žít se těmito těžko rozložitelnými komplexy aromatických uhlovodíků nebo odpady dřeva [17]. Ostatní kvasinky jsou finální součástí detritového řetězce, na jehož konci se v procesu mineralizace do půdy dostávají biogenní prvky v anorganické podobě (CO_2 , NH_3 , SO_4^{4-} , H_2PO_4^- a alkalické ionty) a mikroorganismy získávají energii pro život. Jsou-li finálním produktem dále téměř nerozložitelné humusové látky organického původu, jedná se o humifikaci. V půdě vždy převažuje proces mineralizace nad humifikací, což je v kontrastu s tím, že humus vzniká výrazně rychleji než produkty mineralizace. Rozklad organického odpadu je z chemického pohledu enzymatickou oxidací a je tedy k němu zapotřebí dostatek kyslíku. Za anaerobních podmínek jsou finálními produkty vedle CO_2 i methan, sirovodík nebo různé alkoholy a je za těchto podmínek mírně upřednostňována tvorba humusu před mineralizací [37, 38, 39]. Rychlost rozkladu organického materiálu v půdě je výrazněji ovlivněna složením půdní bioty, její enzymatickou aktivitou a mikroklimatickými podmínkami, než dostupností kyslíku [38].

Mikroorganismy v půdě jsou také schopny aktivně napomáhat při bioremediaci. Díky jejich metabolickým aparátům jsou kvasinky schopny sorbovat z půdy těžké kovy, inhibovat toxické a jinak škodlivé látky. Tohoto se využívá především v odvětvích odpadového hospodářství a ochrany životního prostředí [38].

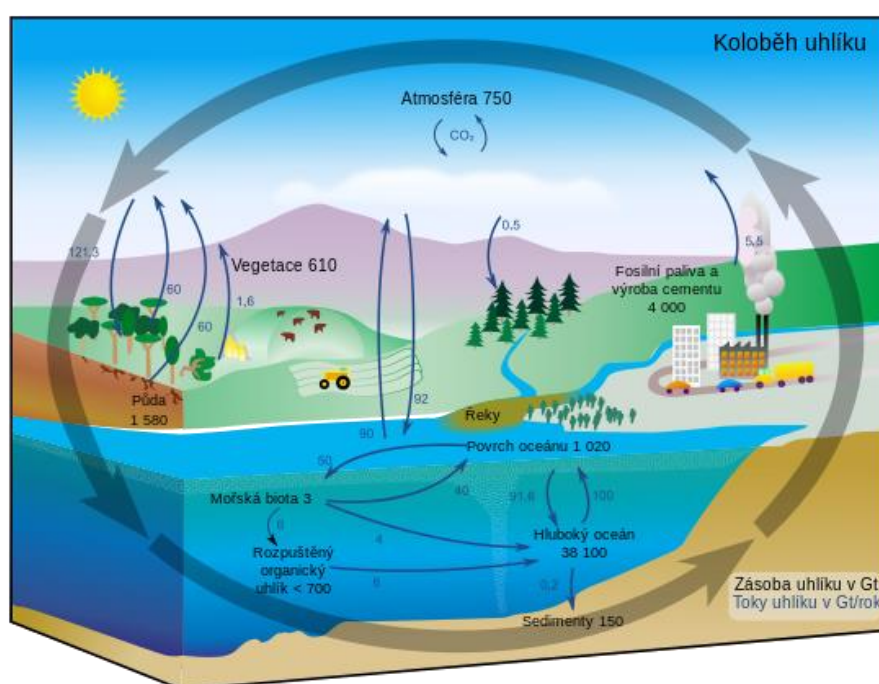
Mikroorganismy hrají mimořádnou roli i při koloběhu prvků v přírodě, který je nezbytnou podmínkou zachování života na Zemi. Recirkulace uhlíku, dusíku, síry a fosforu, jakožto nejdůležitějších biogenních prvků, se účastní všechny živé organismy. Mikroorganismy včetně mikroskopických hub, hrají v tomto procesu nezastupitelnou roli, a to díky schopnosti mineralizace všech organických sloučenin biologického původu [9].

Cyklus uhlíku

Nejdůležitějším ze všech cyklů je pro všechny život na Zemi cyklus uhlíku, který je neoddelitelně spojen s cyklem vodíku a kyslíku [9, 38]. Jedná se o biogeochemický proces, kdy uhlík cyklicky prostupuje hlavními čtyřmi rezervoáry uhlíku na planetě, a sice atmosférou, hydrosférou, pedosférou/litosférou a biosférou [40]. V atmosféře je uhlík přítomen v plynném skupenství, v podobě oxidu uhličitého, methanu a popřípadě oxidu uhelnatého. V hydrosféře se uhlík vyskytuje v podobě rozpuštěného oxidu uhličitého a ve formě uhličitů jako anorganická kyselina uhličitá, čímž se podílí na okyselování vod. Vedle toho je ve vodách uhlík součástí živé i neživé bioty. Půdní obaly Země zahrnují elementární uhlík, uhlík ve formě uhličitů, uhlík jako součást fosilních paliv a znovu jako součást neživých těl organismů. Největším rezervoárem uhlíku je biosféra, protože uhlík je součástí jednak detritu, tak je i organicky vázaný ve všech tělech živých organismů [38, 41]. Bilance obsahu uhlíku v jednotlivých rezervoárech se liší a je ovlivňována mnoha faktory, mezi něž patří i negativní zásah člověka do přírody prostřednictvím spalování fosilních paliv nebo celoplošným odlesňováním půd [41, 42].

Jednou z nejvýznamnějších složek koloběhu uhlíku v přírodě je anorganický oxid uhličitý. Ten je v atmosféře obsažen asi 0,03 % a může ji opustit dvěma způsoby. První variantou je přeměna uhlíku vyššími rostlinami, řasami a cyanobakteriemi prostřednictvím fotosyntézy na organické uhlikaté sloučeniny, které si organismy zabudovávají do svých těl, přičemž je uvolňován do atmosféry plynný kyslík. Druhou variantou je pak zachycení organického CO_2 molekulami vody, přičemž dojde k jeho zadržení v hydrosféře [9, 38, 43].

Těla autotrofních organismů, která obsahují organický uhlík, slouží jako potrava pro všechny ostatní živočichy včetně člověka a mikroorganismy. Tyto látky slouží jednak jako stavební částice organismu, ale také jako zdroj energie, která se uvolňuje při dýchání. Při dýchání také část uhlíku opouští reservoár biosféry v podobě oxidu uhličitého a stává se opět součástí atmosféry, kde slouží jako substrát pro fotosyntézu. Zbylý organický uhlík vázaný na biomasu je po její smrti podroben mikrobiální mineralizaci v půdě za vzniku oxidu uhličitého a vody, čímž se koloběh uzavírá. Největší kompetiční zájem mikroorganismů je o nejjednodušší organické odpady, jako sacharidy, polysacharidy (škrob, celulóza, hemicelulózy) a bílkoviny. Mezi nejobtížněji rozložitelné patří tuky, vosky a lignin. Při mineralizaci vzniká vůbec největší množství oxidu uhličitého na planetě, a to asi 80 %. Dalšími přirozenými producenty CO₂ jsou rostliny (15 %) a živočichové (5 %) [9, 38, 44]. Schéma koloběhu uhlíku v přírodě je zobrazeno na Obrázku 1.



Obrázek 1: Koloběh uhlíku v přírodě [1]

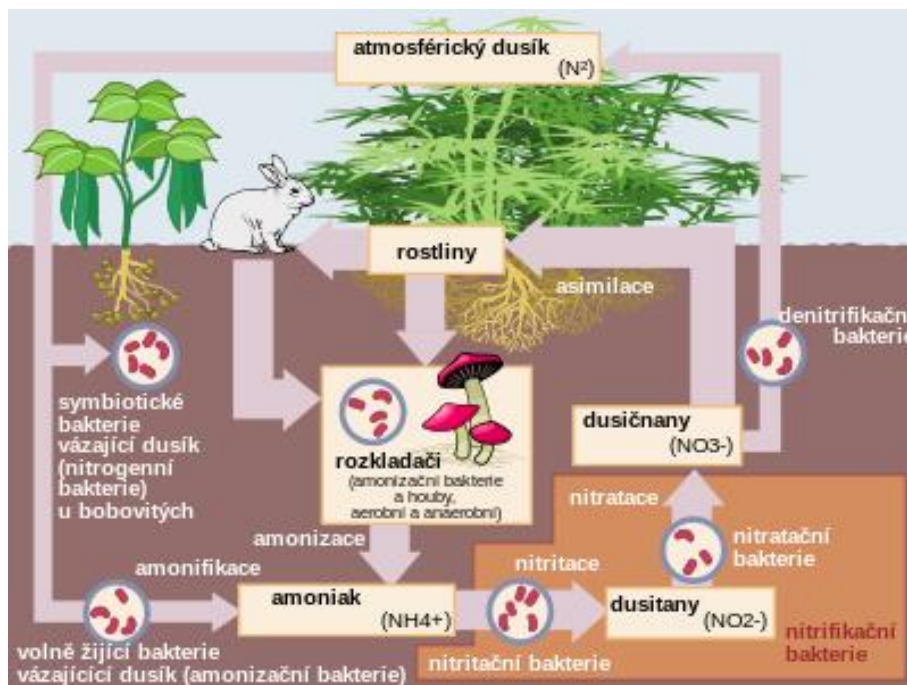
V přírodě může docházet také k zadrži uhlíku v jednom z rezervoárů. Děje se tomu tak například pohlcením oxidu uhličitého alkalickými vodami, kdy vznikají ložiska vápence. Horniny, ač obsahují uhlík, jsou pro fotosyntézu nedostupné. Uvolněny mohou být lokální změnou pH a tyto změny může zapříčinit půdní mikroflóra. Dále je uhlík součástí ložisek ropy a zemního plynu. V neposlední řadě dochází k hromadění těžko rozložitelných látek rostlinného původu ve formě humusu, který se za extrémních hodnot pH stává rašelinou. Akumulace humusu v půdě sice do jisté míry může zvyšovat úrodnost půdy, ale zároveň dochází i ke zvyšování obsahu dusíku v půdě [38].

Cyklus dusíku

Dusík je spolu s dalšími biogenními prvky základním stavebním kamenem těl všech živých organismů. Biochemický proces, v rámci něhož dusík cirkuluje mezi atmosférou, terestriální sférou a hydrosférou, se nazývá koloběh dusíku [38, 45].

Více než 98 % celkového dusíku na naší planetě se koloběhu vůbec nezúčastňuje a je uloženo v litosféře. Největším rezervoárem dusíku je tedy atmosféra, ale plynný elementární dusík je biologicky využitelný jen pro malou skupinu mikroorganismů. V životním prostředí se můžeme setkat celkem se sedmi základními podobami dusíku, jedná se o plynný N_2 , organicky vázaný dusík, amonné ionty, dusitany, dusičnany, oxid dusný a oxid dusnatý. Za to, že dusík cirkuluje pravidelně v jednotlivých podobách naším životním prostředím, vděčíme mikroorganismům. Ty hrají v cyklu dusíku významnou roli a každá jeho obrátka je tvořena souborem reakcí: fixace, amonifikace, nitrifikace, denitrifikace a asimilace. Poté se koloběh uzavírá a začíná znovu [9, 38, 46].

Prvním krokem koloběhu dusíku je jeho přestup z atmosféry do pedosféry. Atomární dusík je chemicky velmi nereaktivní a jeho redukce je kvůli silné trojné vazbě energeticky hodně náročná. Fixace se proto může dít dvěma způsoby. Velmi malé procento plynného dusíku může být biologicky fixováno světelnými výboji například při bouři, naprostá většina je ale fixována prostřednictvím diazotrofních bakterií. Tyto bakterie jsou vybaveny nitrogenázovým enzymatickým aparátem, který katalyzuje reakci dusíku s kationty vodíku za vzniku amoniaku. Amoniak je poté bakteriemi dále zpracováván a zabudován do organických sloučenin jejich buňek nebo je podroben činnosti nitrifikačních bakterií (Obrázek 2). Aktivita nitrogenázy je podmíněna anaerobním prostředím, teplotou kolem 25 °C, dostupností živin a fosforu. Mezi významné fixátory patří bakterie rodu *Azobacter*, *Rhizobium*, *Clostridium*, *Nostoc*, dále aktinomycety, např. rod *Frankia* nebo zástupci domény *Archea* a sinic. Tito mohou žít v půdě volně nebo v symbióze, známá je například symbióza hlízkoovitých bakterií s kořenovým systémem rostlin čeledi *Fabaceae* (bobovité) [9, 38, 47].



Obrázek 2: Koloběh dusíku v přírodě [1]

Všechny živé organismy obsahují ve svých tělech organicky vázaný dusík (aminokyseliny, nukleové kyseliny, močovina, chlorofyl), a ten se po jejich smrti nebo společně s exkrementy dostává do půdy. Takto vázaný dusík je ale pro rostliny nepřijatelný a teprve po jeho zpracování

heterotrofními mikroorganismy na amoniak může dojít k jeho asimilaci. Amonifikace je univerzální proces pro bílkoviny, nukleové kyseliny i močovinu a děje se za účasti jak bakterií (*Bacillus*), tak aktinomycet a hub (*Trichoderma*, *Aspergillus*, *Mucor*). V procesu amonifikace je kritická teplota, pH a vlhkost [38, 48].

Dalším krokem mineralizace je přeměna vzniklého amoniaku až na dusičnany. Amoniak podléhá biologické oxidaci za účasti půdních nitrifikačních mikroorganismů, které ji využívají k zisku energie. Nejprve dochází k nitritaci na dusitany a následně k nitrataci na dusičnany, které jsou rozpustné ve vodě a prakticky ihned mohou být odváděny z půdy a akumulovány ve vodních tocích. Stejným procesem procházejí i amonné soli pocházející z umělých hnojiv, z čehož vyplývá, že s narůstajícím neekologickým zemědělstvím dochází i ke zvyšování rizika kontaminace pitné vody dusičnany, které jsou pro člověka toxické a mutagenní [9, 38, 48]. V obou krocích nitrifikace může jako vedlejší produkt vznikat N_2O nebo NO , čímž dochází k úniku dusíku zpět do atmosféry. K nejvýznamnějším nitrifikačním mikroorganismům patří bakterie *Nitrobacter*, *Nitrosomonas*, *Nitrococcus*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, plísně *Penicillium*, *Aspergillus* [38], nebo kvasinky *Candida*, *Geotrichum*, *Rhodotorula*, *Sacchchromyces* a *Williopsis* [17].

Dusík, který je přítomen v půdě v minerální formě dostupné pro rostliny, je jimi asimilován a zabudováván do jejich těl v procesu, kterému se říká imobilizace. V prostředí, které je bohaté na využitelné zdroje dusíku, dochází k prudkému nárůstu biomasy [38].

Posledním krokem koloběhu dusíku je denitrifikace, kdy dochází k uvolňování oxidů dusíku nebo atomárního dusíku zpět do atmosféry [48]. Při denitrifikaci dochází k opětovné redukci oxidované formy dusičnanů za vzniku oxidu dusného nebo až N_2 . Proces probíhá anaerobně a kyslík z dusičnanových aniontů slouží mikroorganismům jako akceptory elektronů namísto kyslíku. Schopnost denitrifikovat mají bakterie rodu *Peudomonas*, *Micrococcus*, halofilní *Archea* nebo plísně *Fusarium* [38].

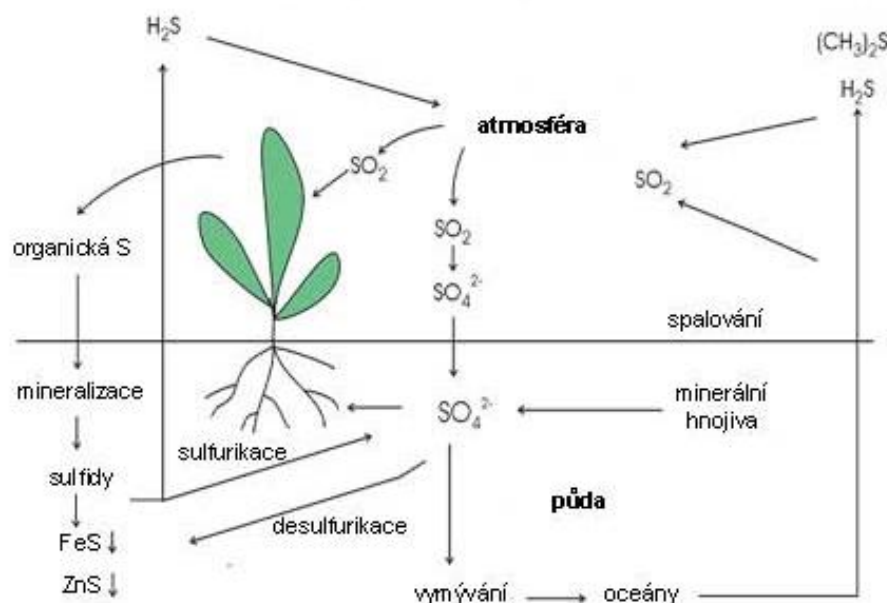
Cyklus síry

Síra se v přírodě vyskytuje především jako součást hornin, rozpuštěná ve formě sulfátů nebo jako součást tlejícího organického materiálu. V menší míře je síra zastoupena v atmosféře, a to v plynném skupenství nebo jako aerosol. Do vzduchu se síra dostává vulkanickou činností, ale také vlivem spalování fosilních paliv a spolu s průmyslovými zplodinami [38].

Z hlediska oxidačního stupně se síra vyskytuje nejčastěji jako elementární, v redukované formě jako sirovodík nebo sirouhlík, v oxidované formě jako síran, siřičitan nebo oxid siřičitý. Organicky je síra vázaná v aminokyselinách cystein a methionin. Každá z těchto forem síry je využitelná pro jinou skupinu organismů, a tak mezi těmito stavy cykluje v biogeochemickém procesu zvaném koloběh síry [9, 38].

Sled reakcí v koloběhu síry je v podstatě analogický s koloběhem dusíku. Jedná se o mineralizaci, sulfurikaci a desulfurikaci, imobilizaci a volatilizaci. Schéma průběhu je ukázáno na Obrázku 3. Svoji nezastupitelnou roli při jednotlivých přeměnách hrají opět mikroorganismy [38].

Pro rostliny, houby a většinu mikroorganismů jsou jedinou využitelnou formou síry její sírany, popřípadě vzdušný SO_2 , z nichž si syntetizují sirné organické látky, které slouží jako výživa. Z chemického hlediska se jedná o asimilativní redukci a jejím produktem jsou R-SH sloučeniny [9, 38, 49].



Obrázek 3: Koloběh síry v přírodě [1]

Organické sirné sloučeniny slouží nejenom jako výživa pro rostliny, ale zároveň jsou substrátem, který půdní mikroorganismy přemění v procesu mineralizace na plynný sirovodík, který uniká do vzduchu. Této oxidace se účastní bakterie rodu *Beggiatoa*, *Thiothrix* nebo *Thiobacillus*. Při tomto procesu se uplatňují extracelulárně produkované enzymy sulfatázy, které reakci katalyzují. Vzniklý sirovodík je na vzduchu oxidován na elementární síru nebo je sirnými bakteriemi oxidován nejprve na síru a poté znovu až na síran [38, 49]. Schopnost oxidace síry byla pozorována také u kvasinek *Rhodotorula*, *Williopsis* a *Saccharomyces*, které produkují thiosírany, sulfáty a tetrathionáty [17].

Opačným procesem jsou desulfurizační redukce, při kterých dochází za účasti anaerobních bakterií k přeměně síranu nebo síry na sirovodík. Síran v těchto procesech slouží obdobně jako akceptor elektronů pro oxidační procesy. Mezi tyto anaerobní bakterie patří rody *Desulfotomaculum* nebo *Desulfovibrio*. Zvýšená produkce sirovodíku je negativní jev, protože vede k okyselení životního prostředí a zvyšuje riziko koroze [9, 38, 49].

Cyklus fosforu

Fosfor patří společně s dusíkem k nejdůležitějším živinám, které ovlivňují růst rostlin a mikroorganismů, řídí energetické děje v buňce, transformace genů a je součástí biomembrán. Na rozdíl od dusíku se jej vyskytuje v přírodě mnohem méně, a to v závislosti na matečné hornině. Převážná většina fosforu je v přírodě ve formě PO_4^{3-} iontů, anorganicky vázaná v minerálech se solemi hliníku, železa a vápníku. Tyto minerály jsou jen velmi málo rozpustné, což ještě víc znemožňuje jejich příjem rostlinami. Organicky vázaný fosfor se v přírodě vyskytuje jako součást odumřelých těl organismů, kořenových exsudátů nebo půdní bioty [38]. Atmosféra je z hlediska obsahu fosforu nedůležitá, protože za běžných teplot a tlaků jsou fosfor a jeho sloučeniny téměř výhradně pevné látky. Cyklus fosforu v přírodě cirkuluje tedy především mezi litosférou, hydrosférou a biosférou [50].

Přeměna fosforu v půdě je složitý biogeochemický proces, který zahrnuje biologické, chemické a mikrobiální změny, hlavní roli ale zajišťují tektonické pochody litosférických desek. Z toho vyplývá, že cyklus fosforu je dlouhodobý proces. Na změny koncentrace fosforu v přírodě má opět vliv člověk, a to zejména nešetrným používáním hnojiv obsahujících fosfor nebo těžbou fosforečných minerálů (fosfát, apatit) [51].

Rostliny a mikroorganismy přispívají k uvolňování fosforu tak, že vlivem svého metabolismu produkují do půdy anorganické kyseliny, které mohou disociovat a vodíkové kationty se potom podílí na rozpouštění fosfátů, čímž je zpřístupňují biotě. Tuto schopnost mají v půdě zejména bakterie rodu *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, mykorhizické houby [38] a kvasinky rodu *Candida*, *Geotrichum*, *Rhodotorula* a *Williopsis* [17].

Kromě rozpouštění fosfátů dochází k uvolňování fosforu také působením extracelulárních enzymů fosfatáz, které mineralizují organické fosforečné látky. Tento enzymatický aparát mají nejen mikroorganismy, ale i některé vyšší rostliny [38].

Fosfor uvolněný do půdy rostliny a mikroorganismy přijímají nejlépe ve formě H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} a poté PO_4^{3-} . V podmínkách dostatečné dostupnosti uhlíku jej zabudovávají do svých organismů, naopak při omezených zdrojích uhlíku může dojít ke ztrátám fosforu do půdy, kde jej odplaví podzemní voda. Společně s vodními toky se fosfor dostává do moří a oceánů, kde se ukládá do sedimentů a koloběh se uzavírá [38].

2.5 Extracelulární enzymové aktivity

Extracelulární enzymy jsou biologické katalyzátory, které jsou syntetizovány uvnitř buňky, ale následně jsou sekretovány přes buněčné stěny do okolního prostředí. Jejich primární funkcí je štěpit makromolekuly látek vně organismu na menší, jednodušší oligomery až monomery, které buňka následně přijímá jako zdroj výživy a energie [52]. Půdní kvasinky jsou na produkci takovýchto enzymatických aparátů závislé, protože půdy jsou bohaté na organický odpad a pro jeho degradaci jsou specifické enzymy nezbytné. Produkce jednotlivých enzymů se druh od druhu kvasinky může lišit [53]. Extracelulární enzymy jsou buňkami produkovány převážně konstitučně v malých množstvích. To organismu umožňuje rychlé reakce na změny dostupného substrátu v okolí bez toho, aby na syntézu enzymů vynaložil zbytečnou energii, a zároveň to umožňuje rychlou adaptaci, kdy po rozeznání substrátu jsou jím potřebné enzymy indukovány ve větší míře [54].

Většina půdních kvasinek má schopnost produkovat extracelulární enzymy v širokém teplotním intervalu, přičemž optimum produkce je 4 - 20 °C, což jim umožňuje kolonizovat půdy různých typů. Nejhojněji produkovány jsou celulózy a různé esterázy [27], přičemž mezi vůbec největší producenty extracelulárních enzymů patří *Candida*, *Trichosporon* a *Aureobasidium pullulans* [55, 56].

Zástupci půdních kvasinek jsou méně fermentativní než třeba kvasinky kolonizující stromy a rostliny. Jedním z důvodů, proč tomu tak může být, je jejich závislost na aerobním metabolismu, popřípadě nedostatek jednoduchých zkvasitelných cukrů v půdě [21, 57]. Výjimku tvoří opět rod *Candida*, např. *Candida solani*, která je výrazně fermentativní, a to i v oblastech velmi znečištěných půd [23]. Kvasinky běžně vykazují širokou schopnost asimilace, vyhovují jim jednak dříve zmíněné organické materiály, ale také téměř všechny

cukerné zdroje jako glukóza, sacharóza, maltóza, xylóza, laktóza a škrob, většina využívá také inositol [21, 22].

V produkci extracelulárních enzymů se můžeme setkat s rozdílem u basidiomycet a askomycet. Zatímco basidiomycety produkují především esterázy, pro askomycety je charakteristická produkce lipáz. Basidiomycety také často produkují kaseinolytické enzymy a chitinázy, typicky se jedná o zástupce rodu *Cryptococcus* [56].

Důležité je zmínit, že kvasinky, stejně jako všechny ostatní mikroorganismy, produkují enzymy výhradně proto, aby přežili. Jejich metabolismus je maximálně úsporný a enzymy jsou tedy produkovány jen v nejmenším nutném množství a jen tehdy, jsou-li potřeba. Na druhé straně, vyrábět enzymy synteticky je velmi obtížné a finančně náročné, proto mají mikroorganismy obrovský biotechnologický potenciál. Abychom je mohli využívat, musí být dobře pochopen jejich metabolismus, popsáno chování a změny, které nastanou v závislosti na změnách kultivačních podmínek. Teprve poté můžeme s mikroorganismy pracovat tak, aby samy prosperovaly, a jako bonus nám přinášely užitek [13].

2.5.1 Proteázy

Proteázy patří mezi enzymy z třídy hydroláz. Nejpočetnější skupinou jsou proteázy, jež se za účasti vody podílí na hydrolýze peptidových vazeb bílkovinných substrátů. Jednotlivé proteázy se od sebe liší původem, lokalizací, vlastnostmi, specifitou, mechanismem působení a tím i možnostmi využití. Podle původu rozeznáváme proteázy živočišné (pepsin, trypsin), rostlinné (papain, ficin), bakteriální, virové a houbové [58]. Z kvasinek patří mezi hlavní producenty proteáz *A. pullulans*, *Yarrowia lipolytica*, rody *Candida* a *Kluyveromyces*. Produkce proteáz je kmenově specifická a může být ovlivňována složením média, pH, teplotou, dostupností kyslíku nebo velikostí inokula [57].

Průmyslově se proteázy využívají při výrobě pracích prostředků, v kožedělnictví, v mlékárenství jako syřidlo, v pekárenství pro zkrácení doby kynutí těsta a v pivovarnictví předchází kalení piva. Masný průmysl je využívá k tenderizaci masa, přidávají se do krmných a výživných směsí [58].

2.5.2 Lipázy

Lipázy patří mezi esterázy, které katalyzují hydrolýzu esterových vazeb v tukách [58, 59]. Nejčastěji se používají lipázy z pankreatu, krevní plazmy, mléka, olejnatých rostlin, bakterií a plísní [58]. Mezi kvasinkami je produkce lipázy poměrně běžná a produkují ji kvasinky napříč různými životními prostředími, např. *Candida*, *Galactomyces* nebo *Trichosporon* [57, 60]. V roce 2014 byly na lipázovou aktivitu testovány některé druhy kvasinek pocházející ze Sbírký kultur kvasinek SAV v Bratislavě, kdy jako největší producenti byli vyhodnoceni *Meyerozyma guilliermondii*, *Yarrowia lipolytica*, *Pseudozyma fusiformata* [61].

V průmyslu se používají k ovlivnění chuti, zejména při výrobě sýrů, k prodloužení trvanlivosti chleba, urychlují zrání čokolád a jsou součástí digestivních přípravků [58].

2.5.3 Glykosidázy

Glykosidázy jsou enzymy, které katalyzují hydrolýzu glykosidických vazeb mezi cukernými jednotkami. Pro tyto enzymy je charakteristická přísná substrátová specifita, kterou ovlivňuje

především D, L konfigurace, α , β charakter anomerního uhlíku a velikost štěpené molekuly [58].

Amylázy

Amylázy hydrolyzují škrob, glykogen a další polysacharidy, ve kterých se vyskytují α -1, 4-glukosidové vazby [58]. U lidí a dalších savců jsou produkovány ve slinách a díky nim cítíme sladkou chuť i u chuťově nevýrazných polysacharidů. Amylázy jsou produkovány také rostlinami a mikroorganismy [62]. Dělíme je na α , β a γ amylázy. U některých mikrobiálních kmenů byla zaznamenána také produkce amylolytických enzymů, které uvolňují tetrasacharidy z větvených polysacharidů a také tzv. odvětvující enzymy, mezi které patří pullulanázy a isoamylázy. Mezi mikrobiální producenty těchto enzymů patří bakteriální rody *Bacillus*, *Pseudomonas* [58], z kvasinek pak *Schwanniomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Aureobasidium*, *Pichia*, *Lipomyces* a *Trichosporon* [63]. Průmyslově se amylázy využívají k výrobě cukerných sirupů, biodetergentů, prostředků na mytí nádobí a pracích prášků. Mají velké uplatnění v pivovarnictví, pekařství, při výrobě škrobu a také jsou využívány v textilním a papírenském průmyslu. Biotechnologicky významné jsou pro farmaceutický průmysl a při výrobě bioethanolu [58, 63].

β -glukosidázy

Další enzymy patřící mezi glykosidázy jsou β -glukosidázy. Ty katalyzují štěpení glykosidických vazeb koncových neredukujících β -D-glukosidů a oligosacharidů za uvolnění glukózy [64]. Podle substrátové specifity je dále dělíme na celobiázy, aryl- β -glukosidázy a β -glukosidázy [65]. Mezi kvasinky, které produkují extracelulární β -glukosidázy, patří rod *Candida*, *Debaryomyces*, *Saccharomyces*, zatímco *Pichia*, *Hansenula* a *Dekkera* produkují β -glukosidázy intra i extracelulárně. Tyto enzymy jsou zodpovědné za uvolňování aromatických látek při výrobě vína [66].

Celulázy

Celulázy jsou součástí složitějšího enzymového systému, který řídí degradaci nativní celulózy. Produktem štěpení jsou monomery glukózy, kratší polysacharidy a oligosacharidy [67]. Celulázy jsou produkovány mikroorganismy a prvky, přičemž jim nestačí pouze produkce těchto enzymů, ale musí být schopny také produkovat enzymy na štěpení složitějších hemicelulózových a lignocelulózových komplexů. Průmyslově se pro produkci využívají pouze houby *Aspergillus niger* a *Trichoderma viride* [58]. Mezi kvasinkami jsou největšími producenty rody *Candida*, *Trichosporon* a *Pseudomonas*, přičemž množství produkováných enzymů výrazně ovlivňuje složení kultivačního média [68]. Celulázy jsou v potravinářství využívány při instantizaci kávy nebo čaje, při úpravách konzistence hub a zeleniny nebo při izolaci rostlinných bílkovin. V zemědělství se využívají jako digestiva krmných směsí [58]. Velký biotechnologický význam mají při fermentaci celulóзовých odpadů za vzniku biopaliv a bioethanolu [68].

Polygalakturonázy

Polygalakturonázy patří také mezi glykosidázy a podílí se na metabolismu pektinových látek. Pektin je vysokomolekulární heteropolysacharid. Obsahují ho buněčné stěny všech vyšších rostlin a na rozklad je poměrně obtížný. Monomerem jeho lineárního úseku molekuly je částečně esterifikovaná galakturonová kyselina. Po deesterifikaci monomerů galakturonové kyseliny pektinmethylesterázou hydrolyzují polygalakturonázy vazby mezi monomery galakturonové kyseliny. Tyto enzymy jsou produkovány rostlinami, mikroorganismy, hmyzem i protozoou, přičemž endocelulární produkce je pozorována častěji [58]. Extracelulárně produkují tyto enzymy rody *Candida*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Pichia* a *Pseudozyma* [57]. Průmyslově se polygalakturonázy využívají při zpracování ovocných šťáv, při jejich maceraci i čištění, a také jako stabilizátory [58].

Chitinázy

Chitinázy jsou enzymy, které hydrolyzují glykosidické vazby chitinu. Chitin je v přírodě velmi rozšířený, je součástí buněčných stěn hub a exoskeletu některých živočichů. Chitin tvoří složku buněčné stěny i u mnohých patogenních organismů, čímž jim zajišťuje ochranu před vnějším prostředím i prostředím v těle hostitele. Štěpením chitinu na menší chitinoooligomery přispívají chitinázy ke koloběhu uhlíku a dusíku v přírodě a umožňují jeho další využití v průmyslu, zemědělství a medicíně. Chitinázy jsou produkovány bakteriemi, kvasinkami, aktinomycetami, houbami, rostlinami i lidmi. Produkce chitináz kvasinkami byla zaznamenána např. u rodů *Pichia*, *Candida*, *Hansenula*, *Saccharomyces*. V zemědělství se chitinázy využívají jako biokontroloři posklizňových patogenů, v medicíně zase při léčbě astma. Další biotechnologické využití nachází chitinázy při přípravě farmaceuticky významných chitinoooligosacharidů a N-acetyl-D-glukosaminů, při přípravě jednobuněčných proteinů, při izolaci protoplastů kvasinek a hub, jako kontroloři patogenních hub a morfogeneze komárů [69, 70].

2.5.4 Lakázy

Enzym lakáza patří mezi oxidoreduktázy a katalyzuje jednoelektronovou oxidaci fenolických sloučenin. Struktura enzymu bývá komplexní dimer nebo trimer, jehož kofaktorem je měď. Lakázy jsou produkovány rostlinami, bakteriemi i houbami, a jsou zodpovědné za degradaci ligninu, který obsahuje přírodní fenoly [58, 71, 72]. Mezi producenty lakáz z řady kvasinek patří rod *Cryptococcus*. Na rozdíl od lakáz produkováných bakteriemi, nacházejí ty kvasinkové hojně uplatnění v potravinářství, při stabilizaci piva, vína a ovocných džusů, a také v pekařství. Lakázy mohou kromě toho najít uplatnění při barvení textilu, bělení zubů nebo při bioremediaci životního prostředí, protože jsou schopné degradovat polutanty [73, 74].

3 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem práce bylo testování schopnosti kvasinek, které byly izolovány pracovníky Sbírkou kultur kvasinek, Chemický ústav SAV, z různých typů půdy v oblastech jihozápadního Slovenska (půda pod ovocnými stromy a kontaminovaná půda) produkovat extracelulární enzymové aktivity, a to: proteázovou, lipázovou, amylázovou, celulázovou, β -glukosidázovou, polygalakturonázovou a chitinázovou.

Nevyhnutelnou součástí práce byla také optimalizace metody pro screening chitinolytických enzymů kvasinek, protože taková metoda nebyla dosud ve Sbírce kultur kvasinek zavedena.

Extracelulární enzymové aktivity půdních kvasinek byly porovnávány s aktivitami kvasinek izolovaných z jiných zdrojů, zejména z ovocných stromů. Současně se hledaly případné vnitrodruhové a mezidruhové souvislosti v produkci těchto enzymů.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál a přístroje

4.1.1 Chemikálie

Anhydrid kyseliny octové, Lachema (ČR)
Agar, Merck (Německo)
Arbutin, Loba-Chemie (Rakousko)
Bromkresolová červeň, Lachema (ČR)
Citran sodný, Spolek pro chemickou a hutní výrobu (ČR)
Dekahydrát síranu hořečnatého, Lachema (ČR)
D-glukóza, Slavus (Slovensko)
Dihydrogenfosforečnan draselný, Lachema (ČR)
Granulovaný kvasničný extrakt, Merck (Německo), Biolife (Itálie)
Heptahydrát hydrogenarseničnanu sodného, Lachema (ČR)
Heptahydrát síranu železnatého, Lachema (ČR)
Hydrogenfosforečnan draselný, Riedel-de Haën Ag Seelze-Hannover (Německo)
Hydrogenuhličitan sodný, Lachema (ČR)
Hydroxid draselný, Lachema (ČR)
Hydroxid sodný, Lachema (ČR)
Chitin, Sigma (Německo)
Chlorid sodný, Slavus (Slovensko)
Chlorid vápenatý, International Enzymes Limited (Velká Británie)
Chlorid železitý, Cambrian Chemicals (Velká Británie)
Jodid draselný, Lachema (ČR)
Karboksymethylcelulóza (CMC), Merck (Německo)
Kyselina boritá, Sigma (Německo)
Kyselina citrónová, Slavus (Slovensko)
Kyselina D-galaktopyranuronová, Fluka (Švýcarsko)
Kyselina chlorovodíková, Merck (Německo)
Kyselina octová, Slavus (Slovensko)
Kyselina sírová, Merck (Německo)
Molybdenan amonný, Lachema (ČR)
N-acetyl-D-glukosamin, Fluka (Švýcarsko)
p-dimethylaminobenzaldehyd, Sigma (Německo)
Pektan sodný, Fluka (Švýcarsko)
Pektin, Copenhagen (Dánsko)
Pentahydrát síranu měďnatého, Lachema (ČR)
Pepton, Merck (Německo)
Rozpustný čistý škrob, Lachema (ČR)
Rubrum Congo indicator, Spolek pro chemickou a hutní výrobu (ČR)
Síran amonný, Merck (Německo), Slavus (Slovensko)
Skim-milk powder, Merck (Německo)
Sublimovaný jód, Lachema (ČR)

0,4% Trypan Blue, Sigma-Aldrich (Německo)
 Tween 80, Lachema (ČR)
 Uhličitan vápenatý, Slavus (ČR)
 Vinan draselno-sodný, Lachema (ČR)
 Želatina „Gelatine sheets gold“, Loba-chemie (Rakousko)

4.1.2 Biologický materiál

Pro kultivaci a následný screening enzymatických aktivit bylo použito 68 kmenů kvasinek, které byly získány ze Sbírky kultur kvasinek (CCY), Chemický ústav SAV Bratislava, Slovensko. Testované kmeny jsou uvedené v Tabulce 1.

Tabulka 1: Seznam použitých kvasinek

Druh kvasinky	Kmen	Druh půdy
<i>Aureobasidium pullulans</i>	48	ovocný sad
	CCY 27-1-134	ovocný sad
	199	ovocný sad
<i>Barnettozyma californica</i>	31	ovocný sad
	118	ovocný sad
<i>Candida odintsovae</i>	CCY 29-174-2	kontaminovaná
<i>Candida oleophila</i>	111	ovocný sad
<i>Candida solani</i>	CCY 29-23-18	kontaminovaná
<i>Clavispora reshetovae</i>	110	ovocný sad
<i>Naganishia</i> (<i>Cryptococcus</i>) <i>friedmannii</i>	191	ovocný sad
<i>Goffeauzyma gastrica</i>	176	ovocný sad
(<i>Cryptococcus gastricus</i>)	181	ovocný sad
<i>Cryptococcus musci</i>	CCY 17-26-1	kontaminovaná
<i>Saitozyma podzolica</i> (<i>Cryptococcus podzolicus</i>)	210	ovocný sad
<i>Holtermanniella</i>	185	ovocný sad
(<i>Cryptococcus</i>) <i>takashimae</i>	220	ovocný sad
<i>Papiliotrema</i>	49	ovocný sad
(<i>Cryptococcus</i>) <i>terrestris</i>	50	ovocný sad
<i>Cyberlindnera misumaiensis</i>	131	ovocný sad
<i>Cyberlindnera saturnus</i>	98	ovocný sad
<i>Cyberlindnera suaveolens</i>	CCY 38-7-5	kontaminovaná
	CCY 38-7-4	kontaminovaná
<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	177	ovocný sad
	H1'a.2	ovocný sad
<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	91	ovocný sad
	139	ovocný sad
<i>Cystofilobasidium macerans</i>	123	ovocný sad
	140	ovocný sad
	145	ovocný sad
<i>Debaryomyces hansenii</i>	4	ovocný sad
	CCY 41-6-22	kontaminovaná

<i>Galactomyces candidum</i>	55	ovocný sad
	143	ovocný sad
	CCY 16-3-2 (54)	ovocný sad
	CCY 16-3-4 (64)	ovocný sad
	CCY 16-3-6 (119)	ovocný sad
<i>Galactomyces geotrichum</i>	CCY 16-1-34	kontaminovaná
<i>Galactomyces pseudocandidus</i>	CCY 16-3-1 (52)	ovocný sad
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	120	ovocný sad
<i>Issatchenkia terricola</i>	113	ovocný sad
<i>Leucosporidium scottii</i>	165	ovocný sad
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	157	ovocný sad
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	CCY 39-23-13	kontaminovaná
<i>Moniliella oedocephalis</i>	109	ovocný sad
<i>Pichia kluyveri</i>	100	ovocný sad
<i>Pichia manshurica</i>	106	ovocný sad
<i>Rhodotorula glutinis</i>	90	ovocný sad
<i>Rhodotorula vanilica</i>	172	ovocný sad
<i>Rhodotorula pustula</i>	117	ovocný sad
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	136	ovocný sad
<i>Saccharomycopsis crataegensis</i>	115	ovocný sad
<i>Schwanniomyces capriotti</i>	81	ovocný sad
<i>Sporidiobolus metaroseus</i>	125	ovocný sad
<i>Trichosporon akiyoshidainum</i>	70	ovocný sad
	CCY 5-2-1	kontaminovaná
<i>Trichosporon asahii</i>	11	ovocný sad
	CCY 30-19-1	ovocný sad
<i>Trichosporon scarabaeorum</i>	J5za	ovocný sad
<i>Apiotrichum</i> (<i>Trichosporon</i>) <i>dulciturum</i>	69	ovocný sad
<i>Trichosporon</i> <i>laibachii</i> (<i>multisporum</i>)	128	ovocný sad
<i>Apiotrichum</i> (<i>Trichosporon</i>) <i>porosum</i>	61	ovocný sad
	127	ovocný sad
	188	ovocný sad
	CCY 30-18-2	kontaminovaná
<i>Tausonia</i> (<i>Trichosporon</i>) <i>pullulans</i>	129	ovocný sad
	CCY 30-1-15	ovocný sad
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	77	ovocný sad
<i>neidentifikováno</i>	21	ovocný sad

4.1.3 Přístroje

Analytické váhy ABT 120-4M, Kern & Sohn GmbH (Německo)

Autokláv Vaspoteri, Brněnská medicínská technika (ČR)

Automatický počítač buněk TC20, BIO-RAD (USA)

Centrifuga Mikro 200, Hettich Zentrifuge (Německo)

Digestoř

Life-science Spektrophotometer DU 730, BeckmanCoulter (USA)

Mikroskop Nikon ECLIPSE 80i, Nikon Instruments Europe BV (Nizozemí)
Míchačka, Laboratorní přístroje Praha (ČR)
pH metr inoLab pH 720, WTW (Německo)
Plotýnkový vaříč, ETA (ČR)
Předvážky PLE 200-3, Kern & Sohn GmbH (Německo)
Očkovací box Telsar Biostar, Telstar (Španělsko)
Stopky HP Z400 Workstation, HP (USA)
Sušárna, Binder (USA)
Třepačky HS 260 basic, IKA (Německo)
Tyčový mixer, Philips (USA)
Vortex mixer K (VM-300), Gemmy industrial corporation (Taiwan)

4.1.4 Pracovní pomůcky

Büchnerova nálevka
Destičky pro počítání buněk/Dual chamber for cell counter, BIO-RAD (USA)
Filtrační papír
Křemenná kyveta
L-zkumavky (5 ml, 10 ml)
Mikropipety Eppendorf research (10-100 μ l, 100-1000 μ l, 500-5000 μ l, 10 ml), Eppendorf AG (Německo)
Mikrozukumavky Eppendorf-čirá s uzávěrem (1,5 a 2 ml), Eppendorf AG (Německo)
Očkovací jehla
Očkovací klička
Odměrné a běžné laboratorní sklo
Odsávací lahev
Plastové Petriho misky
Stojan na mikrozukumavky Eppendorf
Stojan na zkumavky
Špičky bílé (500-5000 μ l, 10 ml), Sarstedt (Německo)
Špičky modré (200-1000 μ l), Sarstedt (Německo)
Špičky žluté (10-200 μ l), Sarstedt (Německo)
Zkumavky

4.2 Příprava roztoků

4.2.1 Média použitá pro kultivaci kvasinek a stanovení extracelulárních enzymových aktivit

Pektinové médium

Na přípravu 1 000 ml pektinového média byly použity chemikálie uvedené v Tabulce 2. Všechny složky byly rozpuštěny v 1 000 ml vody a míchány na automatické míchačce. Do tohoto roztoku bylo přidáno 12,5 g pektinu a směs byla mixována pomocí mixéru. Objem 10 ml tohoto média byl napipetován do deseti L-zkumavek, objem 5 ml byl pipetován do šedesáti L-zkumavek, které byly následně sterilizovány v autoklávu při 120 °C a 110 kPa po dobu 20 min.

Tabulka 2: Složení pektinového média

Chemikálie	Množství [g/l]
(NH ₄) ₂ SO ₄	10
K ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄ · 10 H ₂ O	1
Kvasničný extrakt	3
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,01

Kapalné chitinové médium

Chitinové médium bylo připraveno smísením 20 ml roztoku solí uvedených v Tabulce 2 a 0,25 g chitinu. Médium bylo rozpipetováno do L-zkumavek, které byly následně sterilizovány v autoklávu při 120 °C a 110 kPa po dobu 20 min.

Kapalné médium s koloidním chitinem

Chitinové médium bylo připraveno v L-zkumavkách smísením 20 ml roztoku solí uvedených v Tabulce 2 s 2,5 ml koloidního roztoku chitinu. Zkumavky byly následně sterilizovány v autoklávu při 120 °C a 110 kPa po dobu 20 min.

Chitinové médium pro kultivaci na Petriho miskách

Jednotlivé složky média uvedené v Tabulce 3 byly smíseny se 100 ml destilované vody. Do 50 ml tohoto roztoku bylo přidáno 0,125 g chitinu a do 50 ml bylo přidáno 2,5 ml koloidního chitinu. Médium bylo sterilizováno v autoklávu při 120 °C a 110 kPa po dobu 20 minut a poté asepticky rozlito na Petriho misky.

Tabulka 3: Složení chitinového média

Chemikálie	Množství [g/100 ml]
(NH ₄) ₂ SO ₄	1
KH ₂ PO ₄	0,1
MgSO ₄ · 10 H ₂ O	0,05
Kvasničný extrakt	0,3
agar	2

Chitinové médium s bromkresolovou červení pro kultivaci na Petriho miskách

Jednotlivé složky média uvedené v Tabulce 4 byly smíseny s 200 ml destilované vody. Do roztoku bylo přidáno 40 µl Tweenu 80 a 10 ml koloidního chitinu. pH roztoku bylo upraveno 1 mol·dm⁻³ roztokem NaOH na hodnotu 4,7. Médium bylo sterilizováno v autoklávu při 120 °C a 110 kPa po dobu 20 minut. Závěrem bylo médium asepticky rozlito na Petriho misky.

Tabulka 4: Složení chitinového média s bromkresolovou červení pro kultivaci na Petriho miskách

Chemikálie	Množství [g/200 ml]
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,6
KH ₂ PO ₄	0,4
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,06
monohydrát kyseliny citronové	0,2
agar	3
bromkresolová červen	0,03

Médium Tween 80

Jednotlivé složky média uvedené v Tabulce 5 byly smíseny s 250 ml destilované vody a sterilizovány v autoklávu při 120 °C a 110 kPa po dobu 20 minut. Odděleně byl sterilizován roztok Tweenu 80, ze kterého bylo na závěr 5 ml odpipetováno do roztoku média. Kompletní médium bylo poté asepticky rozlito na Petriho misky.

Tabulka 5: Složení média Tween 80

Chemikálie	Množství [g/250 ml]
Pepton	2,5
NaCl	1,25
CaCl ₂	0,025
Agar	15

Arbutinové médium

Jednotlivé složky média uvedené v Tabulce 6 byly smíseny s 200 ml destilované vody a sterilizovány v autoklávu při 120 °C a 110 kPa po dobu 20 minut. Na závěr bylo do média přidáno 0,2 ml roztoku FeCl, který byl připraven rozpuštěním 1 g FeCl₃ v 10 ml destilované vody a také sterilizován. Kompletní médium bylo poté asepticky rozlito na Petriho misky.

Tabulka 6: Složení arbutinového média

Chemikálie	Množství [g/200 ml]
arbutin	1
agar	5
Kvasničný extrakt	3

Karboxymethylcelulózové médium

Jednotlivé složky média uvedené v Tabulce 7 byly smíseny s 250 ml destilované vody. Médium bylo sterilizováno v autoklávu při 120 °C a 110 kPa po dobu 20 minut a poté asepticky rozlito na Petriho misky.

Tabulka 7: Složení karboxymethylcelulózového média

Chemikálie	Množství [g/250 ml]
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,5
KH ₂ PO ₄	0,25
MgSO ₄ · 10 H ₂ O	0,125
Kvasničný extrakt	0,75
CMC	1,25
agar	5

Skim milk médium

Bylo smícháno 2,5 g sušeného odstředěného mléka Skim milk powder s 250 ml destilované vody a pH výsledného roztoku bylo upraveno uhličitánem sodným na hodnotu 6,6. Do roztoku bylo přidáno 5 g agaru. Médium bylo sterilizováno v autoklávu při 120 °C a 110 kPa po dobu 20 minut a poté asepticky rozlito na Petriho misky.

Glukózové médium

V kádince bylo smícháno uvedené množství (Tabulka 8) síranu amonného, dihydrogenfosforečnanu draselného a síranu hořečnatého s 250 ml destilované vody. pH tohoto roztoku bylo upraveno přikapáváním kyseliny sírové na hodnotu 4,5. Následně byly do roztoku přidány zbývající složky a médium bylo sterilizováno v autoklávu při 120 °C a 110 kPa po dobu 20 minut. Kompletní médium bylo poté asepticky rozlito na Petriho misky.

Tabulka 8: Složení glukózového média

Chemikálie	Množství [g/250 ml]
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,5
KH ₂ PO ₄	0,25
MgSO ₄ · 10 H ₂ O	0,125
Kvasničný extrakt	0,25
Glukóza	0,25
agar	5

Škrobové médium

V kádince bylo smícháno uvedené množství (Tabulka 9) síranu amonného, dihydrogenfosforečnanu draselného a síranu hořečnatého s 250 ml destilované vody. pH tohoto roztoku bylo upraveno přikapáváním uhličitanu sodného na hodnotu 6,8. Následně byly do roztoku přidány zbývající složky a médium bylo sterilizováno v autoklávu při 120 °C a 110 kPa po dobu 20 minut. Kompletní médium bylo poté asepticky rozlito na Petriho misky.

Tabulka 9: Složení škrobového média

Chemikálie	Množství [g/250]
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,5
KH ₂ PO ₄	0,25
MgSO ₄ · 10 H ₂ O	0,125
Kvasničný extrakt	0,75
škrob	5
agar	3,75

Želatinové médium

128 g želatiny Gelatine sheets gold bylo rozpuštěno za mírného zahřívání v 1 000 ml destilované vody. Roztok byl rozlit do 70 zkumavek a sterilizován v autoklávu při 120 °C a 110 kPa po dobu 20 minut.

4.2.2 Roztoky použité pro vyhodnocování extracelulárních enzymových aktivit

Octan sodný

Rozpuštěním 27,2 g octanu sodného v 1 000 ml destilované vody byl připraven roztok 0,2 mol·dm⁻³ octanu sodného.

0,5% roztok kyseliny pektové (pH = 4,8)

0,5 g pektanu sodného připraveného z přečištěného pektinu totální alkalickou deesterifikací, bylo rozpuštěno ve 40 ml destilované vody a bylo přidáno 30 ml octanu sodného o koncentraci

$0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Do roztoku byla ponořena elektroda pH metru a přikapáváním koncentrované kyseliny octové bylo upraveno pH na hodnotu 4,8. Na závěr byl roztok doplněn destilovanou vodou na objem 100 ml.

Somogyiho činidlo I [75]

V 400 ml destilované vody bylo rozpuštěno 24 g $\text{KNaC}_4\text{O}_4\text{H}_6$, 32 g NaHCO_3 a 36 g Na_2CO_3 . Současně bylo v 1 200 ml destilované vody rozpuštěno 288 g Na_2SO_4 . Roztoky byly umístěny na míchačku a zahřívány. Po úplném rozpuštění všech komponent byly roztoky smíchány dohromady.

Somogyiho činidlo II [75]

V 600 ml destilované vody bylo rozpuštěno 12 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ a 108 g Na_2SO_4 .

Nelsonovo činidlo III [76]

75 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ bylo rozpuštěno v 1 350 ml destilované vody. Do roztoku bylo přidáno 63 ml H_2SO_4 a 9 g $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ rozpuštěných v 75 ml destilované vody. Roztok byl umístěn na 48 hodin do termostatu s teplotou 38°C .

Roztok kyseliny D-galaktopyranuronové

Rozpuštěním 0,003 g monomeru kyseliny polygalakturonové v 14,15 ml destilované vody byl připraven roztok o koncentraci $1 \mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}$. Ze zásobního roztoku byla připravena požadovaná kalibrační řada.

Standardní roztok N-acetyl-D-glukosaminu

0,001 g N-acetyl-D-glukosaminu bylo rozpuštěno v 1 ml destilované vody.

2% roztok koloidního chitinu podle modifikované metody Hsu a Lockwooda [77]

14,6 g práškového chitinu bylo rozpuštěno v 220 ml 37% HCl . Míchání probíhalo na vyhřívané míchačce při 30°C po dobu 60 minut. Koloidní suspenze chitinu byla přečištěna 2 l chladné destilované vody, která byla pomalu přilévána. Směs byla filtrována přes Büchnerovu nálevku a 3krát promyta 5 litry destilované vody, aby se pH ustálilo na 3,5. Koloidní chitin byl rozlít do zásobních lahví a sterilizován v autoklávu při 120°C a 110 kPa po dobu 20 min.

0,1 mol·dm⁻³ citrátový pufr (pH = 5)

Rozpuštěním 21,01 g kyseliny citrónové v 1 000 ml destilované vody byl připraven zásobní roztok $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ kyseliny citrónové a rozpuštěním 29,41 g citranu sodného v 1 000 ml destilované vody byl připraven zásobní roztok citranu sodného o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Na přípravu citrátového pufru bylo smíseno 20,5 ml $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku kyseliny citrónové a 29,5 ml $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku citranu sodného. pH bylo upraveno na hodnotu 5 a poté byl objem doplněn destilovanou vodou na 100 ml.

Ehrlichovo činidlo [78, 79]

10 g *p*-dimethylaminobenzaldehydu bylo rozpuštěno v 100 ml směsi ledové kyseliny octové obsahující 12,5 obj. % koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Směs byla uchovávána v zábrusové lahvi v chladničce a před použitím byla 10krát ředěna kyselinou octovou.

0,7 mol·dm⁻³ tetraboritan draselný

4,3 g kyseliny borité byly rozpuštěny v 90 ml destilované vody. pH bylo pomocí 10% roztoku KOH upraveno na hodnotu 9. Celkový objem byl doplněn destilovanou vodou na 100 ml.

Lugolův roztok

V 300 ml destilované vody byly rozpuštěny 2 g jodidu draselného a 1 g sublimovaného jódu.

Roztok 3% Kongo-červeni

V 150 ml destilované vody bylo rozpuštěno asi 4,5 mg práškové Kongo-červeni.

1 mol·dm⁻³ roztok chloridu sodného

V 100 ml destilované vody bylo rozpuštěno 5,854 g NaCl a dobře promícháno.

4.3 Metody

4.3.1 Příprava, kultivace mikroorganismů a stanovení extracelulárních enzymových aktivit

Pro testování enzymatických aktivit byly použity kvasinky uvedené v Tabulce 1 v biologickém materiálu. Kvasinky byly před odběrem kultivovány ve Sbírce kultur kvasinek SAV v Bratislavě na sladidlovém agaru při teplotě 22 °C.

Stanovení aktivity extracelulárních polygalakturonáz – Somogyiho-Nelsonův test [75, 76]

Ze zkumavek, kde kvasinky rostly na sladidlovém médiu, bylo odebráno vždy po jednom očku kultury do sterilní vody. Suspenze byla promíchána a následně bylo 50 µl každé kultury přeneseno do L-zkumavky s 5 ml pektinového média. Kultivace se prováděla pro každou kulturu paralelně ve dvou zkumavkách. Počáteční koncentrace buněk přenesená na pektinové médium byla přibližně 10⁶ buněk·ml⁻¹. Veškerá počáteční očkování a odběry byly prováděny asepticky v prostředí očkovacího boxu

Zkumavky s mikroorganismy byly umístěny na třepačku, kde byly kultivovány při teplotě 24 °C a za stálého protřepávání při 90 ot·min⁻¹. Kultivace byla ukončena po čtyřech dnech.

Třetí a čtvrtý den kultivace bylo z L-zkumavek sterilně odebráno 1,5 ml vzorku každé kultury do mikrozskumavek. Vzorky byly centrifugovány po dobu 2 min při 10 000 ot·min⁻¹ a supernatant byl použitý na stanovení enzymové aktivity. Kvůli vysoké absorbanci samotného média byl supernatant ředěn vodou v poměru 1:4, popřípadě 1:9.

Reakční směs byla připravena smísením 100 µl vzorku a 100 µl kyseliny pektové. V okamžiku přidání kyseliny pektové byla spuštěno měření času, reakce probíhala po dobu 20 hodin. Referenční zkumavky obsahovaly směs 100 µl vzorku, 100 µl kyseliny pektové a 200 µl směsi Somogyiho činidla I + II (4:1). Po uplynutí reakční doby byla reakce zastavena přidáním 200 µl směsi Somogyiho činidla I + II a všechny zkumavky byly umístěny na 10 min do vroucí lázně. Následně bylo přidáno 200 µl Nelsonova činidla III k odbarvení uvolněných redukujících skupin a 1,4 ml destilované vody. Směs byla promíchána a byla spektrofotometricky změřena absorbance oproti blanku při 530 nm. Aktivita extracelulárních polygalakturonáz byla určena prostřednictvím kalibrační křivky pro monomer kyseliny polygalakturonové.

Pro vybrané kmeny kvasinek *Galactomyces candidum* (CCY 16-3-2, 16-3-4, 16-3-6), *Galactomyces pseudocandidus* CCY 16-3-1, *Tausonia pullulans* (CCY 30-1-15) a *Trichosporon asahii* (CCY 30-19-1) byl stanoven průběh produkce polygalakturonáz v intervalu 168 hodin.

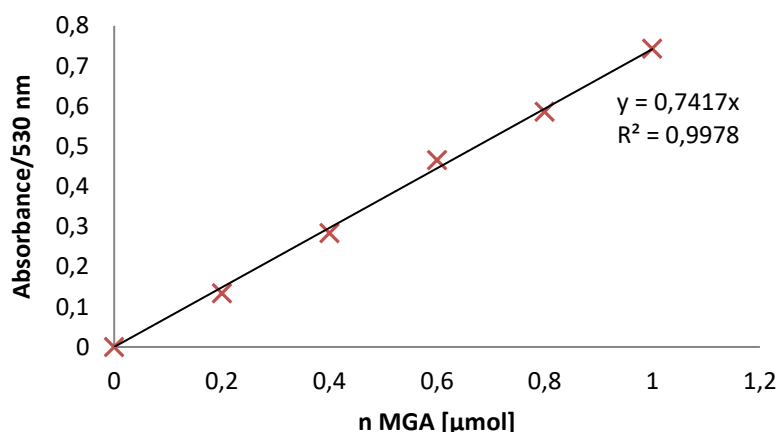
Z L-zkumavek s naočkovanými kvasinkami na pektinovém médiu bylo ve 24 hodinových intervalech z každého kmene sterilně odebráno 500 μl vzorku do mikrozkušavky a pomocí Somogyi-Nelsonova testu byl spektrofotometricky stanoven přírůstek redukujících skupin. Z naměřených hodnot byly sestaveny aktivitní křivky pro jednotlivé kmeny.

- **Stanovení kalibrační křivky D-galaktopyranuronové kyseliny (MGA)**

Pro sestrojení kalibrační křivky byl použit zásobní roztok kyseliny D-galaktopyranuronové o koncentraci $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Roztok byl pipetován do zkumavek, čímž byla připravena kalibrační řada MGA o látkovém množství 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1,0 μmol . MGA ve zkumavce byl doplněn destilovanou vodou na objem 200 μl a následně bylo přidáno 200 μl směsi Somogyiho činidla I a II (4:1). Směs byla vložena do vroucí vodní lázně na 10 min. Závěrem bylo přidáno 200 μl Nelsonova činidla III a 1,4 ml destilované vody. Směs byla promíchána pomocí Vortex mixeru a následně byla proměřena absorbance na spektrofotometru při vlnové délce 530 nm. Složení roztoků pro kalibraci MGA je v Tabulce 10 a kalibrační křivka je zobrazená na Obrázku 4.

Tabulka 10: Složení kalibrační směsi

n MGA [μmol]	blank	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
1 μM MGA [μl]	0	40	80	120	160	200
Voda [μl]	200	160	120	80	40	0
Somogyiho činidlo I+II [μl]	200	200	200	200	200	200
Nelsonovo činidlo III [μl]	200	200	200	200	200	200



Obrázek 4: Kalibrační křivka MGA

Počítání buněk pomocí přístroje TC20™ Automated Cell Counter (BIO-RAD)

Ze zkumavky, kde kvasinky rostly na pektinovém médiu, bylo odebráno 10 μl vzorku do mikrozkušavky. Ke vzorku bylo přidáno 10 μl 0,4% Trypan Blue, mikrozkušavka byla promíchána a 5 min inkubována při laboratorní teplotě. Poté bylo 10 μl této směsi napipetováno

do počítačové destičky a tato byla vložena do přístroje TC20™ Automated Cell Counter. Přístroj zobrazil počet buněk v 1 ml média a jejich viabilitu.

Stanovení aktivity extracelulárních lipáz (esteráz) – test štěpení Tweenu 80

Kvasinky byly v prostředí sterilního očkovacího boxu přeneseny ze sladidového agarů na Petriho misku obsahující médium s Tween 80. Kultivace probíhala 6 dní při 22 °C. Produkce lipáz byla prokázána, pokud v okolí mikroorganismu vznikla čirá, jasná zóna.

Stanovení aktivity extracelulárních proteáz – test asimilace Skim milk

Kvasinky byly v prostředí sterilního očkovacího boxu přeneseny ze sladidového agarů na Petriho misku obsahující médium se Skim milk. Kultivace probíhala 6 dní při 22 °C. Produkce proteáz byla prokázána, pokud v okolí mikroorganismu vznikla bílá zóna.

Stanovení aktivity extracelulárních proteáz – ztekucení želatiny

Kvasinky byly v prostředí sterilního laminárního boxu zaočkovány vpichem do zkumavky se želatinou. Kultivace probíhala 10 dní při 7 °C. Produkce proteáz byla prokázána ztekucením želatiny v horní části zkumavky a v okolí vpichu.

Stanovení aktivity extracelulárních celuláz – test štěpení karboxymethylcelulózy

Kvasinky byly v prostředí sterilního očkovacího boxu přeneseny ze sladidového agarů na Petriho misku obsahující médium s karboxymethylcelulózou. Kultivace probíhala 7 dní při 22 °C. Pro vyhodnocení byly misky s kulturami na 15 minut zality 3% roztokem Kongo-červení. Poté byl roztok Kongo-červení slit a misky byly zality 1 mol·dm⁻³ roztokem NaCl. Kolem kolonií, které produkovaly celulázy, vznikla žluto-zelená zóna.

Stanovení aktivity extracelulárních β-glukosidáz – test štěpení arbutinu

Kvasinky byly v prostředí sterilního očkovacího boxu přeneseny ze sladidového agarů na Petriho misku obsahující arbutinové médium. Kultivace probíhala 6 dní při 22 °C. Produkce β-glukosidáz byla prokázána tvorbou tmavě hnědé zóny kolem kolonie mikroorganismu.

Stanovení aktivity extracelulárních α-amyláz – test asimilace kukuřičného škrobu

Kvasinky byly v prostředí sterilního očkovacího boxu přeneseny ze sladidového agarů na Petriho misku obsahující škrobové médium. Kultivace probíhala 7 dní při 22 °C. Pro vyhodnocení byly misky zality Lugolovým roztokem a kolem kolonií, které štěpily škrob, vznikla jasná čirá zóna. Pokud škrob nebyl štěpen, kolonie zůstaly modře zabarvené škrobem.

Test tvorby škrobu

Kvasinky byly v prostředí sterilního očkovacího boxu přeneseny ze sladidového agarů na Petriho misky obsahující glukózové médium. Kultivace probíhala 7 dní při 22 °C. Misky byly pro vyhodnocení zality Lugolovým roztokem a kolonie, které produkovaly škrob, se zbarvily tmavě modře, až černě. Ty kvasinky, které škrob neprodukovaly, měly kolem sebe světlou zónu.

4.4 Optimalizace metody pro stanovení extracelulární chitinázové aktivity

Pro stanovení extracelulární chitinázové aktivity kvasinek byly použity celkem čtyři metody, dvě metody s pevným médiem (pevné chitinové médium a metoda s bromkresolovou červení v chitinovém médiu) a dvě využívající tekuté médium (Somogyi-Nelsonův test, Ehrlichovo stanovení). Pro testování v kapalných médiích byly vybrány druhy *Aureobasidium pullulans* (CCY 27-1-134) a *Papiliotrema terrestris* (50), pro chitinové médium na miskách *Aureobasidium pullulans* (CCY 27-1-134) a pro chitinové médium s bromkresolovou červení bylo použito 14 kmenů kvasinek izolovaných z půd pod ovocnými stromy.

4.4.1 Testování chitinázové aktivity při kultivaci na pevném médiu

Chitinové médium na miskách [69]

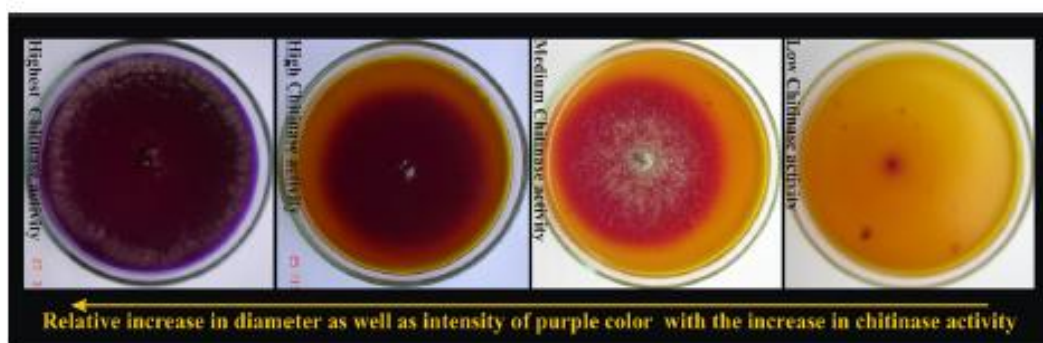
Na Petriho misky, obsahující pevné médium s chitinem, byl inokulován ze sladidového agaru druh *A. pullulans*. První miska obsahovala médium s koloidním chitinem, ve druhé misce byl obsažen nerozpustný chitin. Kultivace probíhala při teplotě 22 °C po dobu 14 dní. V případě produkce chitináz by došlo k vytvoření čiré zóny (Obrázek 5) okolo kolonie kvasinky v důsledku štěpení polymerního chitinu na N-acetyl-D-glukosamin [69].



Obrázek 5: Vznik zóny v důsledku produkce chitináz u aktinomycet [2]

Chitinové médium s bromkresolovou červení [80]

Na Petriho misky, které obsahovaly pevné médium s koloidním chitinem a bromkresolovou červení bylo inokulováno 14 druhů kvasinek z ovocných půd. Kultivace probíhala po dobu 12 dní při teplotě 22 °C. Princip metody spočívá ve změně barvy média v okolí kolonie v důsledku změny pH na alkalické, což je způsobeno štěpením chitinu na monomerní N-acetyl-D-glukosamin. Pokud kvasinky produkují chitinázy, dojde k naštěpení média a jeho barva se změní ze žluto-oranžové na fialovou (Obrázek 6) [80].



Obrázek 6: Ve směru šipky narůstající chitinázová aktivita projevující se vznikem fialové zóny. Producentem jsou houby rodu *Trichoderma* [3]

Paralelně byla produkce chitináz ověřena kultivací kvasinek v kapalném médiu s koloidním chitinem a následnými testy aktivit Ehrlichovou a Somogyi-Nelsonovou reakcí.

4.4.2 Testování chitinázové aktivity při kultivaci v kapalném médiu

Do L-zkumavek byly v očkovacím boxu ze sladidového agaru přeneseny druhy *A. pullulans* (CCY 27-1-134) a *Papiliotrema terrestris* (50), počáteční koncentrace byla asi 10^6 buněk·ml⁻¹ média. Kultivace probíhala 10 dní na třepačce, při 90 ot·min⁻¹ a teplotě 28 °C. Paralelně kultivace probíhala v médiu s nerozpustným a koloidním chitinem. Každý den byl odebrán 1 ml média pro vyhodnocení chitinázové aktivity.

Ke stanovení byl použit současně supernatant a roztok média s buňkami. Pro odebrání supernatantu byly vzorky centrifugovány po dobu 2 min při 10 000 ot·min⁻¹. Kvůli vysoké absorbanci samotného média, byl vzorek pro Somogyi-Nelsonův test ředěn vodou v poměru 1:9.

Somogyiho-Nelsonův test [75, 76]

Reakční směs byla připravena smísením 100 µl vzorku a 100 µl roztoku 2% koloidního chitinu v citrátovém pufru. V okamžiku přidání chitinu bylo spuštěno měření času, reakce probíhala při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin. Referenční zkumavky obsahovaly směs 100 µl vzorku, 100 µl chitinu a 200 µl směsi Somogyiho činidla I + II, v poměru 4:1. Po uplynutí reakční doby byla reakce zastavena přidáním 200 µl směsi Somogyiho činidla I + II a všechny zkumavky byly umístěny na 10 min do vroucí lázně. Následně bylo přidáno 200 µl Nelsonova činidla III k odbarvení uvolněných redukujících skupin a 1,4 ml destilované vody. Směs byla promíchána a přefiltrována přes skládaný filtrační papír do čistých zkumavek. Následně byla spektrofotometricky změřena absorbance oproti blanku při 530 nm. Aktivita extracelulárních chitináz byla určena prostřednictvím kalibrační křivky pro N-acetyl-D-glukosamin.

- **Stanovení kalibrační křivky**

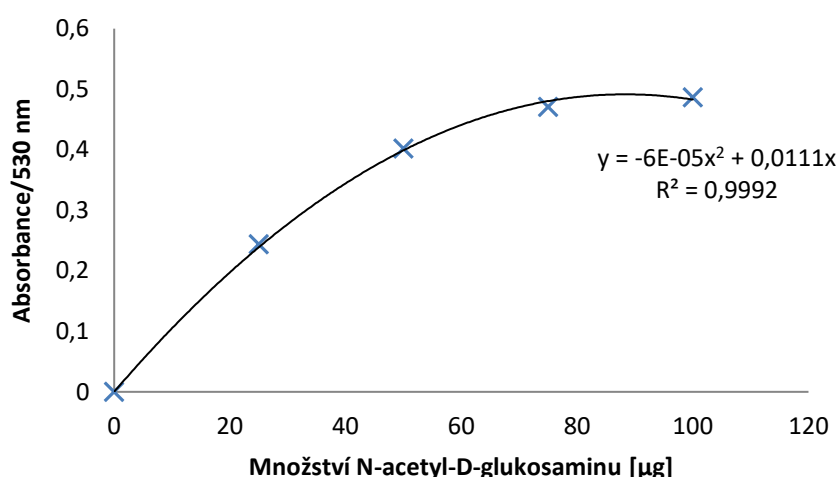
Pro sestavení kalibrační křivky byl použit zásobní roztok monomeru N-acetyl-D-glukosaminu o koncentraci 1 mg·ml⁻¹. Roztok byl pipetován do zkumavek, čímž byla připravena kalibrační řada N-acetyl-D-glukosaminu o obsahu 25; 50; 75 a 100 µg. Roztok ve zkumavce byl doplněn destilovanou vodou na objem 200 µl a následně bylo přidáno 200 µl

směsi Somogyiho činidla I a II (4:1). Směs byla vložena do vroucí vodní lázně na 10 min. Závěrem bylo přidáno 200 μl Nelsonova činidla III a 1,4 ml destilované vody. Směs byla promíchána pomocí Vortex mixeru a zfiltrována do čistých zkumavek přes skládaný filtrační papír. Následně byla změřena absorbance na spektrofotometru při vlnové délce 530 nm. Složení roztoků pro kalibraci N-acetyl-D-glukosaminu je v Tabulce 11 a kalibrační křivka je zobrazená na Obrázku 7.

Tabulka 11: Složení kalibrační směsi pro N-acetyl-D-glukosamin při stanovení podle

Somogyi-Nelsona

Množství N-acetyl-D-glukosaminu [μg]	blank	25	50	75	100
1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ N-acetyl-D-glukosaminu [μl]	0	25	50	75	100
Voda [μl]	200	175	150	125	100
Somogyiho činidlo I+II [μl]	200	200	200	200	200
Nelsonovo činidlo III [μl]	200	200	200	200	200



Obrázek 7: Kalibrační křivka pro N-acetyl-D-glukosamin podle Somogyi-Nelsona

Ehrlichovo stanovení [78, 79]

Ke stanovení bylo do mikrozkušavek odebráno po centrifugaci vždy 25 μl supernatantu. Referenční zkumavky byly 30 min povařeny ve vodní lázni pro inaktivaci enzymu. Poté bylo přidáno 125 μl 0,1 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ citrátového pufru (pH = 5) a 125 μl roztoku 2% koloidního chitinu v citrátovém pufru. Zkumavky byly promíchány a inkubovány v termostatu při 37 °C po dobu 24 hodin. Po uplynutí doby inkubace byly zkumavky zcentrifugovány a z každé bylo odebráno 125 μl vzorku do čistých mikrozkušavek o objemu 2 ml. V digestoři bylo přidáno 25 μl ledového anhydridu kyseliny octové a 125 μl 0,7 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ tetraboritanu draselného. Zkumavky byly promíchány, inkubovány 5 min při laboratorní teplotě a následně vloženy na 5 min do vroucí vodní lázně. Po ochlazení vzorků bylo přidáno 1,5 ml Ehrlichova činidla, 10x ředěného kyselinou octovou. Zkumavky byly opět promíchány a 20 min inkubovány v termostatu při 37 °C. Závěrem byla spektrofotometricky změřena absorbance oproti blanku při 585 nm. Aktivita extracelulárních chitináz byla určena prostřednictvím kalibrační křivky pro N-acetyl-D-glukosamin.

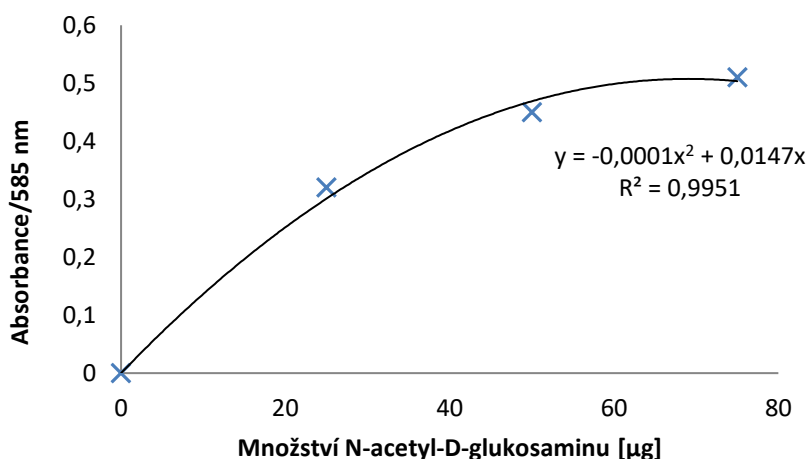
- **Stanovení kalibrační křivky**

Pro sestavení kalibrační křivky byl použit zásobní roztok monomeru N-acetyl-D-glukosaminu o koncentraci $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Roztok byl pipetován do zkumavek, čímž byla připravena kalibrační řada N-acetyl-D-glukosaminu o obsahu 25; 50 a 75 μg . Roztok ve zkumavce byl doplněn destilovanou vodou na objem 125 μl . Poté bylo přidáno 125 μl $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ citrátového pufru ($\text{pH} = 5$) a zkumavky byly promíchány. V digestoři bylo přidáno 25 μl ledového anhydridu kyseliny octové a 125 μl $0,7 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ tetraboritanu draselného. Zkumavky byly promíchány, inkubovány 5 min při laboratorní teplotě a následně vloženy na 5 min do vroucí vodní lázně. Po ochlazení vzorků bylo přidáno 1,5 ml Ehrlichova činidla, 10x ředěného kyselinou octovou. Zkumavky byly opět promíchány a 20 min inkubovány v termostatu při 37°C . Závěrem byla spektrofotometricky změřena absorbance oproti blanku při 585 nm.

Složení roztoků pro kalibraci N-acetyl-D-glukosaminu je v Tabulce 12 a kalibrační křivka je zobrazená na Obrázku 8.

Tabulka 12: Složení kalibrační směsi pro N-acetyl-D-glukosamin při stanovení podle Ehrlicha

Množství N-acetyl-D-glukosaminu [μg]	blank	25	50	75	100
$1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ N-acetyl-D-glukosaminu [μl]	0	25	50	75	100
Voda [μl]	125	100	75	50	25
$0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ citrátový pufr [μl]	125	125	125	125	125
1,5% anhydrid kyseliny octové [μl]	25	25	25	25	25
$0,7 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ tetraboritan draselný [μl]	125	125	125	125	125
Ehrlichovo činidlo [μl]	1500	1500	1500	1500	1500



Obrázek 8: Kalibrační křivka pro N-acetyl-D-glukosamin podle Ehrlicha

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

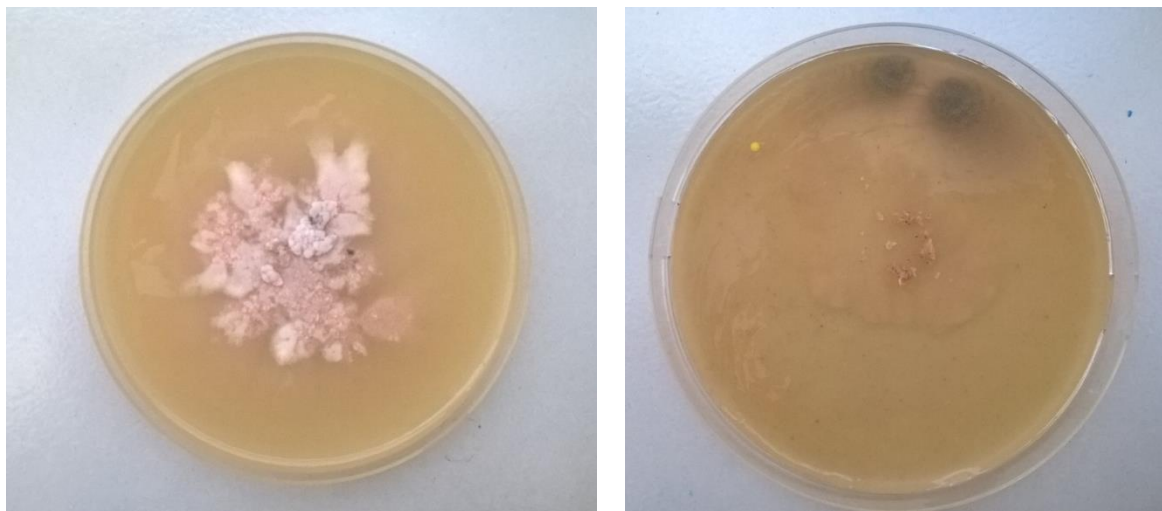
Pro screening enzymových aktivit bylo vybráno celkem 68 zástupců půdních kvasinek, které náležely k 45 druhům. Kvasinky podrobené testům byly izolovány z půd nacházejících se pod ovocnými stromy jihozápadního Slovenska (58) a kontaminovaných půd oblasti Pernek (10), Slovensko. Kvasinky byly testovány na produkci následujících extracelulárních enzymů: polygalakturonázy, proteázy, β -glukosidázy, lipázy, celulázy, α -amylázy, chitinázy a na produkci škrobu podobných látek.

5.1 Optimalizace metody pro screening chitinázové aktivity kvasinek

Metoda pro stanovení chitinázové aktivity kvasinek ve Sbírce kultur kvasinek SAV v Bratislavě dosud zavedená nebyla, proto byly v rámci práce testovány čtyři metody, které byly popsány v literatuře. Dvě metody využívaly tekuté médium s chitinem a dvě miskovou kultivaci na agaru obsahujícím chitin. Zároveň byla prověřena vhodnost koloidního a nerozpustného chitinu pro kultivaci kvasinek.

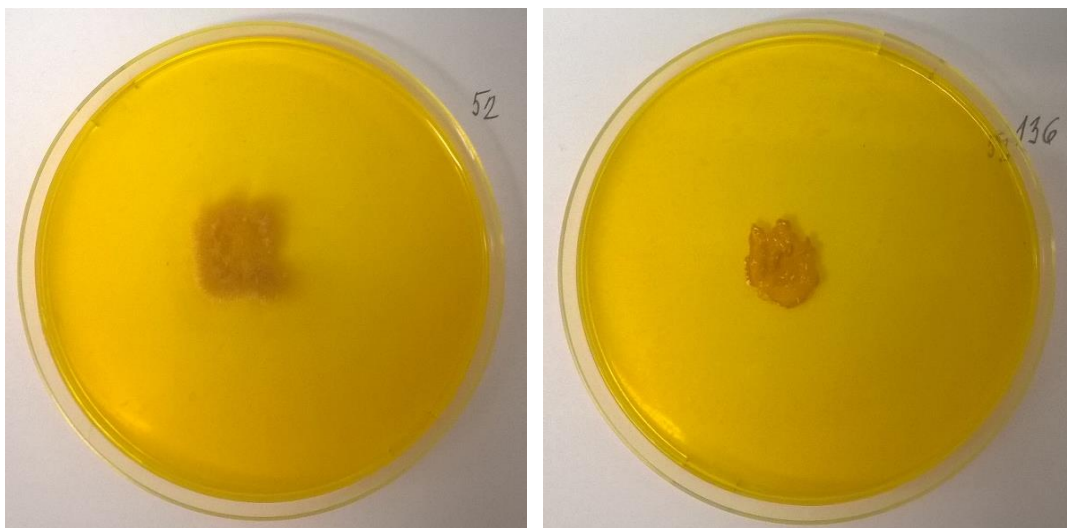
Jako první byla kultivace prováděna na agarovém médiu obsahujícím koloidní a nerozpustný chitin. Testovaným organismem byl *A. pullulans* (CCY 27-1-134).

Koloidní chitin *A. pullulans* vyhovoval lépe, než nerozpustný, protože v prvním případě vytvořil jasně zbarvenou prosperující kolonii, zatímco v druhém případě jevíl růst výrazně slabší (Obrázek 9). Ani v jednom případě ale nedošlo k vytvoření číré zóny v okolí kolonie, tak, jako tomu bylo u testovaných askomycet [69].

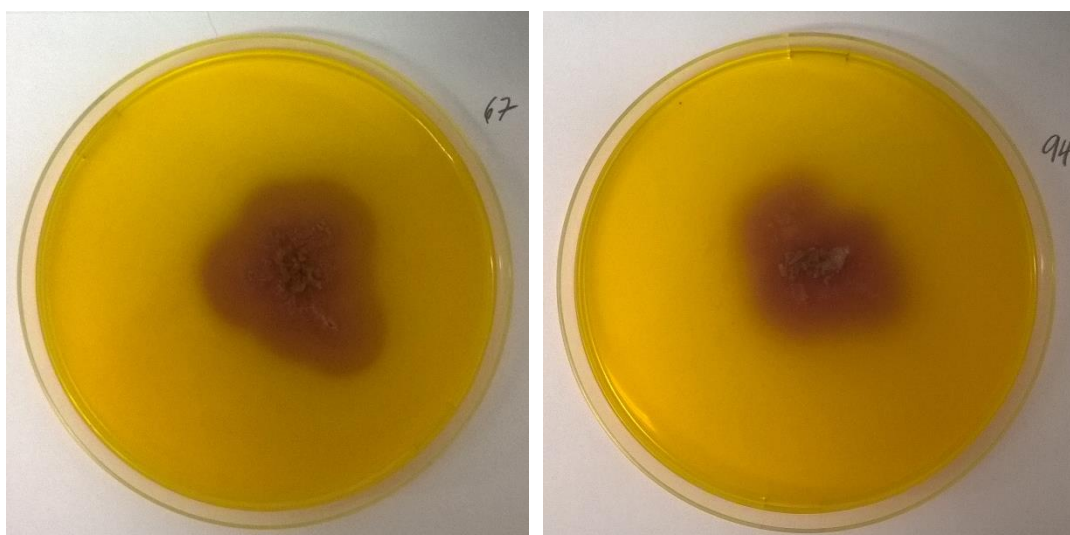


Obrázek 9: *A. pullulans* po 14 denní kultivaci na pevném médiu s koloidním chitinem (vlevo) a na pevném médiu s nerozpustným chitinem (vpravo)

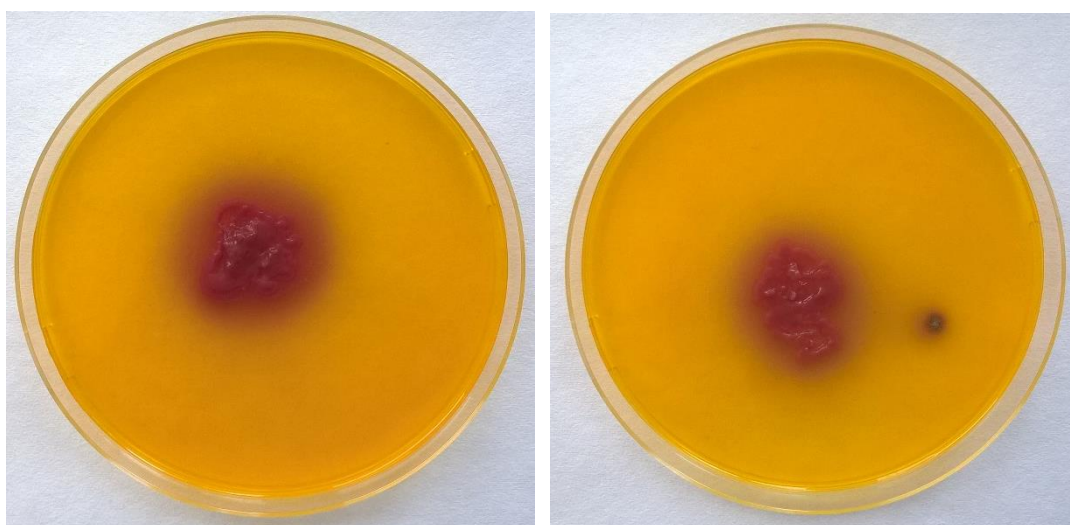
Jako další byla testována kultivace 14 kmenů kvasinek na médiu s koloidním chitinem a bromkresolovou červení. Během experimentu buď nedošlo k vytvoření fialové zóny v okolí kolonie vůbec (Obrázek 12), nebo u některých druhů došlo ke zbarvení buněk, popř. mycélia na fialovou barvu (Obrázek 11). Ke vzniku skutečné fialové zóny došlo pouze u dvou případů, a to je patrné na Obrázku 10.



Obrázek 12: Kultivace kvasinek *G. pseudocandidus* 52 (vlevo) a *S. cerevisiae* 136 (vpravo) na chitinovém médiu s bromkresolovou červení



Obrázek 11: Kultivace kvasinek *Tausonia pullulans* CCY 30-1-15 (vlevo) a *A. pullulans* CCY 27-1-134 (vpravo) na chitinovém médiu s bromkresolovou červení



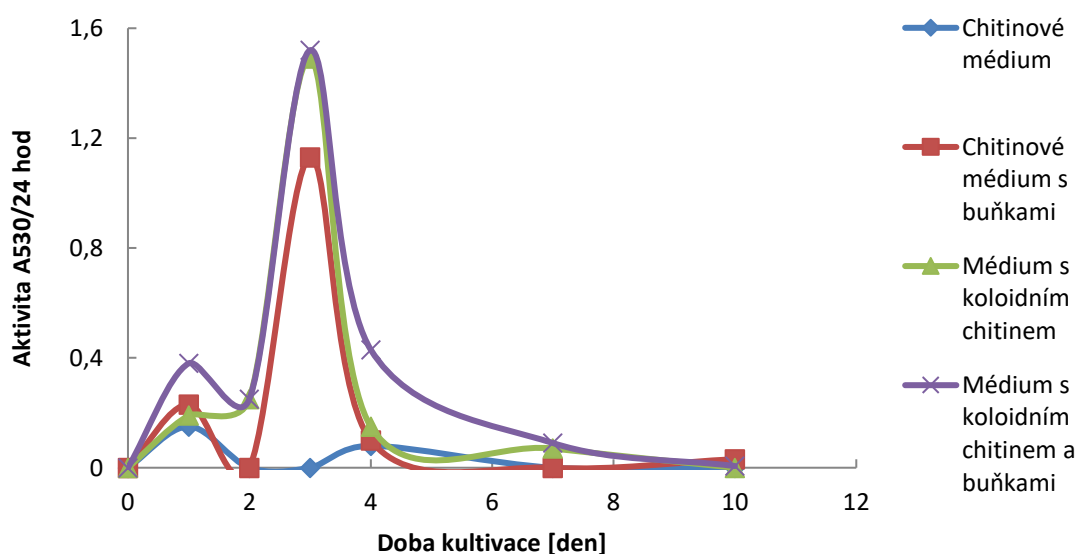
Obrázek 10: Kultivace kvasinek *Sporidiobolus metaroseus* 125 (vlevo) a *Rh. glutinis* 90 (vpravo) na chitinovém médiu s bromkresolovou červení

Fialové zbarvení kolonií mohlo být způsobeno produkcí chitináz, které byly vázané na buněčnou stěnu kvasinek, v důsledku čehož došlo k naštěpení chitinu na N-acetyl-D-glukosamin v bezprostřední blízkosti buňky, ale ne ke vzniku fialové zóny v samotném médiu. Skutečnou příčinou vzniku fialové zóny byla ale pravděpodobněji změna pH média v důsledku metabolismu kvasinky. Skutečnost, že kvasinky mění pH substrátu ku vlastní prospěch, byla studována např. s modelovými mikroorganismy *S. cerevisiae* [81].

Metoda stanovení chitinázové aktivity pomocí změny pH substrátu byla původně navržena pro chitinázy produkované houbami [80] a pro posouzení její vhodnosti pro screening extracelulárně produkovaných chitináz u kvasinek je nutné porovnávat výsledky s výsledky stanovení uvolněného N-acetyl-D-glukosaminu jinou metodou.

Pro kultivaci v kapalném médiu obsahujícím koloidní/nerozpustný chitin byly vybrány kmeny *Papiliotrema terrestris* (50) a *A. pullulans* (CCY 27-1-134). Kultivace byla průběžně vyhodnocována Somogyi-Nelsonovým a Ehrlichovým testem pro stanovení chitinázové aktivity.

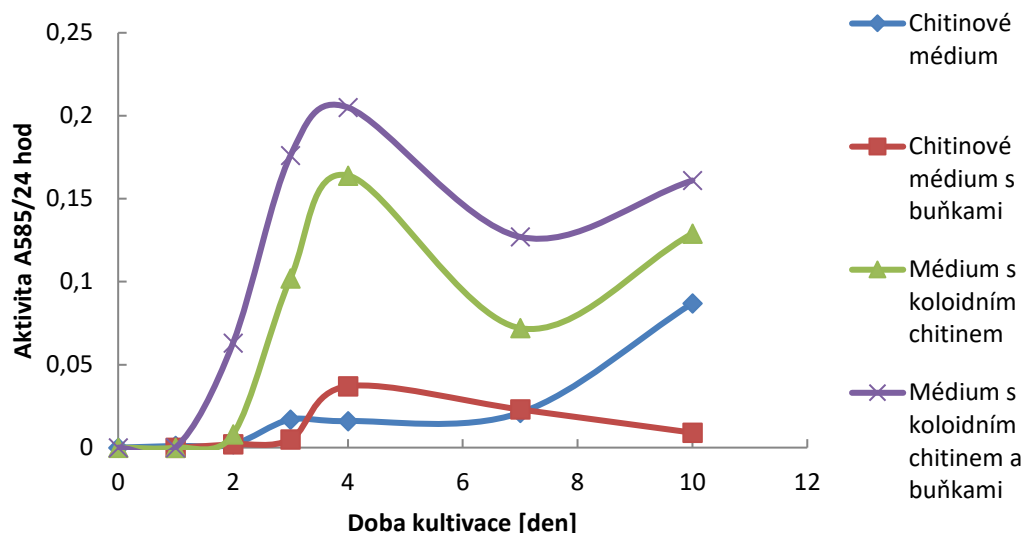
Papiliotrema terrestris chitinázy neprodukoval ani na jednom z použitých chitinových médií. *A. pullulans* chitinázy produkoval, došlo k evidentnímu naštěpení chitinu, což se projevilo vyčířením roztoku kultivačního média, ale enzymová aktivita byla stanovena pomocí Somogyi-Nelsonova testu jen v první a třetí den kultivace (Obrázek 13). Z hlediska screeningu je takový průběh problematický, protože nezabezpečuje spolehlivý výsledek.



Obrázek 13: Chitinázová aktivita pro druh *A. pullulans* podle Somogyiho-Nelsona

Na Obrázku 13 je vidět, že lépe měřitelná aktivita byla v případě média s koloidním chitinem. Vyšší aktivity dosahoval roztok média s buňkami, z čehož vyplývá, že určitý podíl produkovaných chitináz je pravděpodobně povrchově vázaný.

Z Obrázku 14 je patrné, že chitinázová aktivita byla mnohem lépe stanovitelná pomocí Ehrlichovy metody.



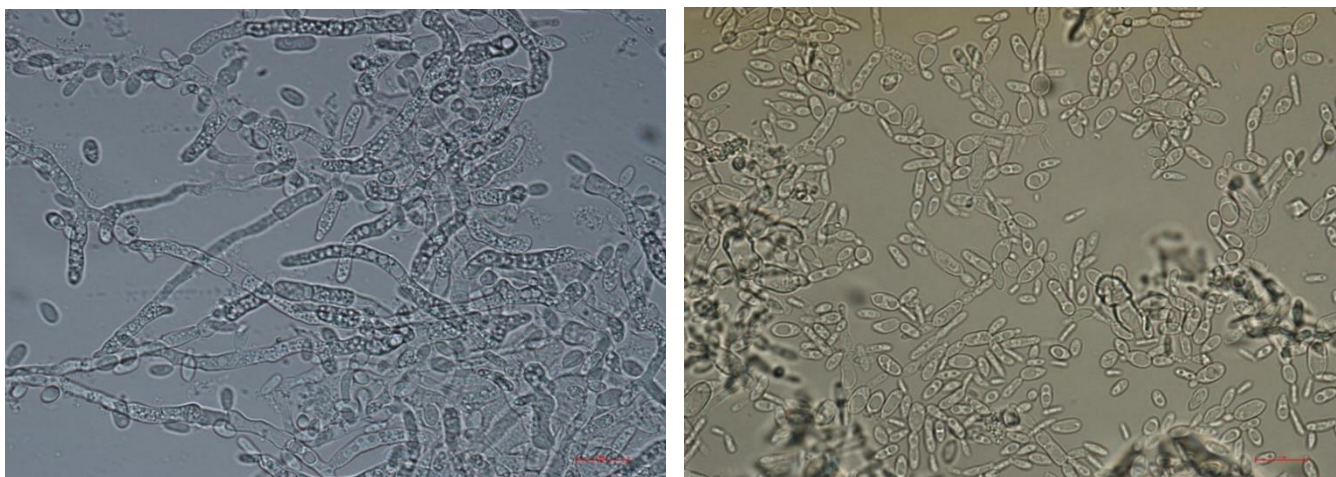
Obrázek 14: Chitinázová aktivita pro druh *Aureobasidium pullulans* podle Ehrlicha

Po 96 hodinách kultivace byl nárůst aktivity nejvyšší, ale aktivitu si *A. pullulans* nadále udržel, a to jak ve vzorku s buňkami, tak pouze s médiem. Opět byla aktivita vyšší u vzorků média s koloidním chitinem a aktivita byla nalezena také na buňkách.

To, že více vyhovujícím substrátem je pro mikroorganismy koloidní chitin, nasvědčuje i mikroskopické pozorování preparátu *A. pullulans*, odebraného třetí a sedmý den kultivace. Zatímco v médiu s nerozpustným chitinem byly přítomny jenom buňky, které se shlukovaly na částicích chitinu (Obrázek 15), v médiu s koloidním chitinem byly od začátku kultivace buňky volně v roztoku a bylo jich mnohem více (Obrázek 16).



Obrázek 15: *A. pullulans* (CCY 27-1-134) rostoucí na nerozpustném chitinovém médiu na počátku kultivace (vlevo) a po sedmi dnech kultivace (vpravo). Zvětšeno 900x



Obrázek 16: *A. pullulans* (CCY 27-1-134) rostoucí na koloidním chitinovém médiu na počátku (vlevo) a po sedmi dnech kultivace (vpravo). Zvětšeno 900x

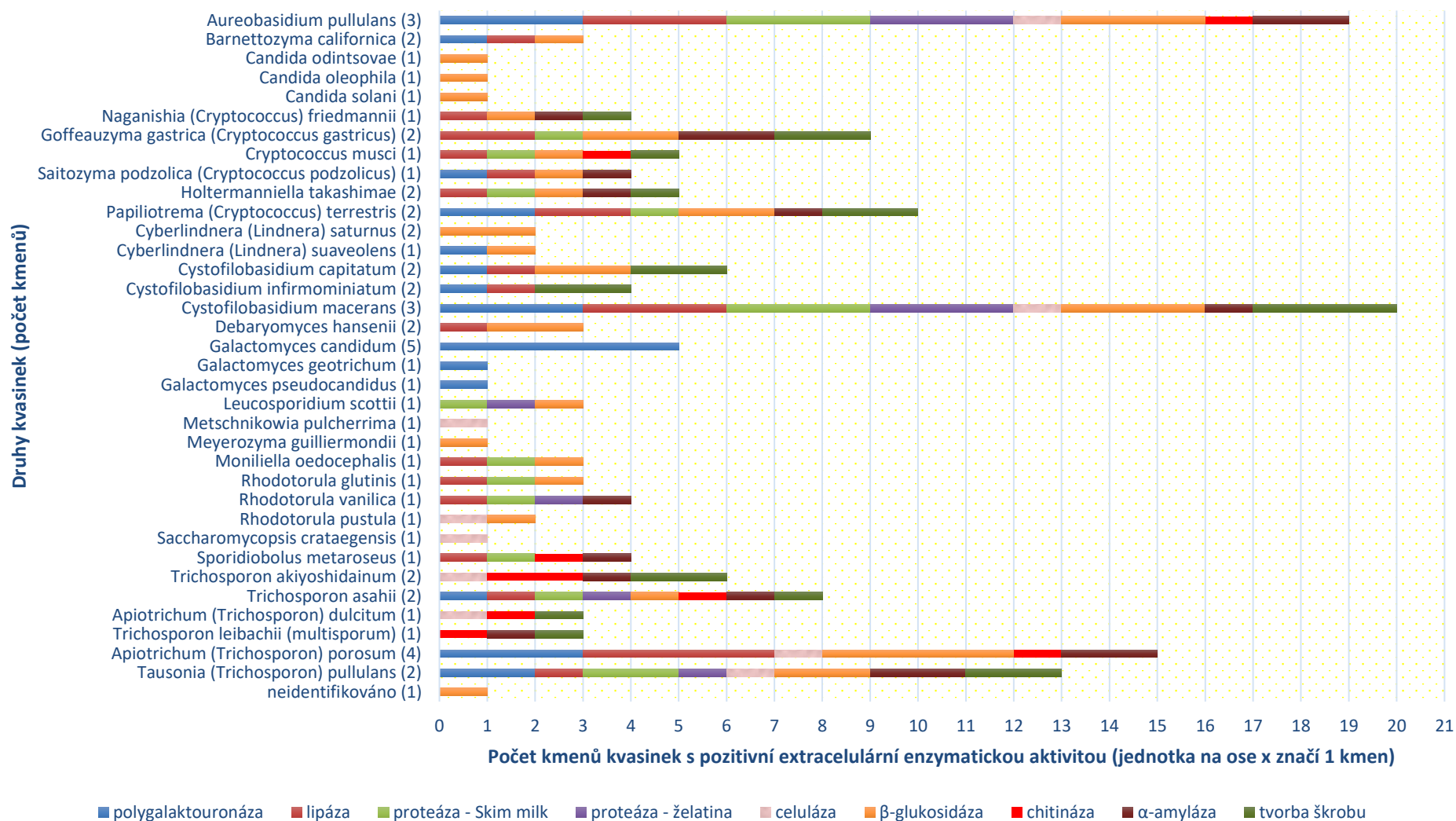
Na základě výše uvedených zjištění byla Ehrlichova metoda stanovení chitináz v kombinaci s kultivací kvasinek v kapalném médiu s koloidním chitinem vyhodnocena jako nejvhodnější a byla použita pro stanovení chitinázových aktivit všech vybraných druhů kvasinek.

5.2 Testování extracelulárních enzymových aktivit kvasinek

Výsledky provedených testování jsou shrnuty v grafu na Obrázku 17 a v tabulce, která je součástí Přílohy

Více jak 75 % testovaných kvasinek exhibovalo alespoň jednu enzymovou aktivitu. Největší spektrum produkovaných aktivit bylo pozorováno u *A. pullulans*, jehož kmen CCY 27-1-134 vykazoval pozitivní výsledky u všech testovaných enzymových aktivit, ale neprodukoval škrobu podobné látky. Mezi největšího producenta extracelulárních enzymů je řazen i podle Zalara [33] a stejné výsledky byly publikovány v práci autorů Buzzini a Martini [56], kteří testovali tropický druh *A. pullulans*. Djekrif a kol. [63] pak řadí *A. pullulans* mezi významné producenty α -amyláz. Testovaný kmen (CCY 27-1-134) byl izolován z půdy pod ovocnými stromy, jejichž mikrobiotou se v roce 2013 zabývala Molnárová a kol. [57]. *A. pullulans* izolovaný z různých částí ovocných stromů byl producentem pouze β -glukosidáz, lipáz a polygalakturonáz. Je pravděpodobné, že při osidlování nutričně bohatšího prostředí, jako jsou plody nebo květy ovocných stromů, si *A. pullulans* vystačí s užším spektrem produkovaných enzymů, než když je v půdě odkázán na tlející organický materiál vyžadující pro rozklad specifický enzymatický aparát. Další testovaný kmen *A. pullulans* č. 199 produkoval šest ze sedmi testovaných enzymů. Negativní byl pouze v případě produkce celulózy a chitináz a také neprodukoval škrobu podobné polysacharidy. *A. pullulans* č. 48 navíc neprodukoval α -amylázy.

Dalším významným producentem byl druh *Tausonia pullulans*, který exhiboval polygalakturonázovou, lipázovou, proteázovou (Skim milk), celulóзовou, β -glukosidázovou i α -amylázovou aktivitu a také produkoval škrobu podobné látky. Pozitivní výsledky produkce lipáz, amyláz a celulózy publikují ve svých studiích také Vakhlu [60], Djekrif [63]



Obrázek 17: Souhrn aktivit extracelulárních enzymů produkovaných půdními kvasinkami. Kmeny, které nevykazovaly žádnou enzymatickou aktivitu, nejsou v grafu uvedeny

a Thongekkaew [68].

Rod *Trichosporon* se jeví jako producent polygalakturonáz, lipáz a β -glukosidáz, protože z 11 testovaných zástupců byla více jak polovina pozitivními producenty. Jako průmyslový producent lipáz byl *Trichosporon* označen i v publikaci Yeast lipases [60] a *Tr. asahii* se využívá jako producent komerčních β -glukosidáz při výrobě vína [82]. *Tr. asahii* ale v rámci tohoto experimentu produkoval enzym β -glukosidáza jen v jednom případě (kmen č. 11), takže se jedná o kmenovou, nikoli vnitrodruhovou schopnost produkce tohoto enzymu. Nejslabší enzymovou aktivitu v rámci rodu vykazovali *Tr. akiyoshidanium* a *Apiotrichum dulcitum*, kteří produkovali jen chitinázy a celulózy. Mimo to byli pozitivními producenty škrobu podobných látek. S ohledem na místo výskytu je pro ně pravděpodobně takovýto enzymový aparát plně dostačující.

Srovnatelnou extracelulární enzymovou aktivitu vykazoval také rod *Cystofilobasidium*. Za vlastnost společnou pro tento rod lze označit produkci polygalakturonáz a lipáz, které byly společné pro pět ze šesti testovaných zástupců (Obrázek 17). Navíc je druh *Cystofilobasidium macerans* producentem extracelulárních proteáz, které byly prokázány u všech kmenů tohoto druhu, a to jak při testech na želatině, tak během kultivace na médiu se Skim milk.

Druhy rodu *Cryptococcus* nejčastěji produkovaly lipázy, β -glukosidázy, α -amylázy a také byly schopny produkce škrobu podobných polysacharidů. Mezi tyto producenty patří např. *Goffeauzyma gastrica*, *Holtermanniella takashimae* (kromě kmene 220) nebo *Naganishia friedmanii*. Naopak *Cr. flavescens* nejvíce produkoval polygalakturonázy, lipázy a proteázy (Skim milk). Produkci amyláz u rodu *Cryptococcus* potvrdil i Djekrif a kol. [63]. Produkce polygalakturonáz byla poměrně slabá, extracelulárně ji exhibovali jen *Papiliotrema terrestris* a *Saitozyma podzolica*. Obdobně nízké produkce polygalakturonáz byly pozorovány i v případě kvasinek na ovocných stromech [57].

Slabými producenty extracelulárních enzymových aktivit byly druhy rodu *Galactomyces*, *Candida* a *Cyberlindnera*, které exhibovaly každý po jedné, respektive dvojí aktivitě. Všechny druhy rodu *Galactomyces* (*candidum*, *geotrichum* *pseudocandidus*) produkovaly polygalakturonázy (Obrázek 17). S ohledem na přirozený výskyt kvasinek rodu *Galactomyces* v mléčných výrobcích byla předpokládána produkce lipáz a proteáz, což se během screeningu nepotvrdilo.

Candida oleophila, *C. solani*, *C. odinstovae*, stejně jako *Cyberlindnera suaveolens* a *Cyberlindnera saturnus* produkovaly β -glukosidázy a štěpily tak arbutin. Produkce β -glukosidáz byla u *Candida* pozorována i u vinných kvasinek [66]. Podle některých zdrojů [60, 68, 83] by *Candidy* měly být producenty polygalakturonáz, celuláz a lipáz. To v rámci screeningu nebylo pozorováno a naopak stejně slabou extracelulární enzymovou aktivitu jevíly i rody *Candida* a *Cyberlindnera* izolované z ovocných stromů [57].

Celkem 10 zástupců nevykazovalo vůbec žádnou enzymatickou aktivitu, a sice *Torulaspora delbrueckii*, *Schwanniomyces capriotti*, *Pichia kluyveri*, *Pichia manshurica*, *Clavispora reshetovae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Cyberlindnera misumaiensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Issatchenkia terricola* a *Trichosporon scarabaeorum*.

5.2.1 Polygalakturonázová aktivita

Produkce polygalakturonáz se ohledem na půdní prostředí zdá být jako nezbytná pro přežití kvasinek. Pektin je součástí buněčných stěn všech vyšších rostlin a tudíž tvoří i výrazný podíl dostupného uhlíkatého zdroje v půdě. Schopnost jeho štěpení na jednodušší sacharidy a tedy možná utilizace je pro půdní mikroorganismy alespoň v počáteční fázi kolonizace velmi důležitá.

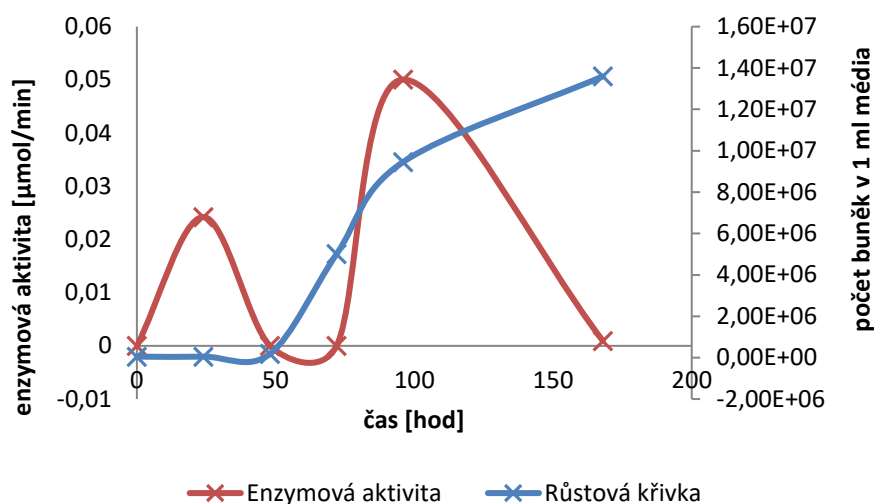
Polygalakturonázová aktivita byla testována u 68 kmenů vybraných kvasinek prostřednictvím Somogyi-Nelsonova testu. Pozitivní výsledky na produkci extracelulárních polygalakturonáz byly stanoveny pro 27 testovaných kvasinek náležících k sedmi druhům (Obrázek 17). Mezi nejvýznamnější producenty patří *A. pullulans*, *Apiotrichum porosum*, *Tausonia pullulans*, *Cys. macerans*, *Cys. capitatum* a všechny druhy rodu *Galactomyces*. Při screeningu enzymových aktivit kvasinek kolonizujících ovocné stromy [57], byla tato aktivita pozorována u *A. pullulans* a *G. candidum*. Oba druhy byly také vybrány jako producenti polygalakturonázy pro purifikaci a charakterizaci tohoto enzymu v práci Jägera [84]. Ve studiích Trindade [85], Strausse [83] a da Silva [86] jsou jako producenti polygalakturonáz označeny některé druhy rodu *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces* a *Pichia*. S těmito výsledky se v předložené práci shoduje pouze aktivita druhu *Papiliotrema terrestris* a *Saitozyma podzolica*.

Stanovení růstových křivek a produkce extracelulárních polygalakturonáz v průběhu kultivace kvasinek na pektinovém médiu

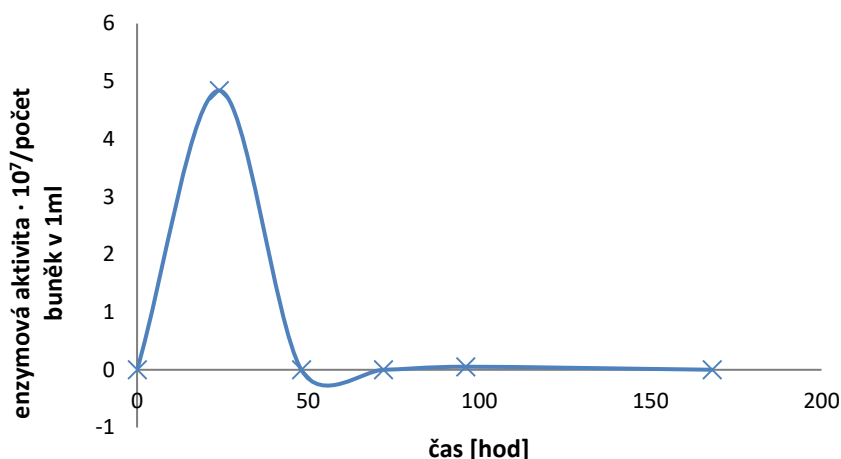
Pro vybrané kmeny *G. candidum* (CCY 16-3-2, 16-3-4, 16-3-6), *Galactomyces pseudocandidus* (CCY 16-3-1), *Tausonia pullulans* (CCY 30-1-15) a *Tr. asahii* (CCY 30-19-1) byly sestaveny aktivitní křivky produkce polygalakturonáz a růstové křivky v průběhu kultivace (168 hodin) na pektinovém médiu.

Trichosporon asahii

Tr. asahii kmen CCY 30-19-1 vykazoval po 48 hodinách kultivace dobrý růst, který si zachoval i v pozdějších stádiích kultivace (Obrázek 18). Produkce polygalakturonáz byla u tohoto kmene dvoufázová a velice nízká, přičemž první aktivitní vrchol nastal po 24 hodinách kultivace a druhý po 98 hodinách (Obrázek 17). První nárůst aktivity je spojován s vyloučením polygalakturonáz za účelem adaptace na médium a přežití. Druhé aktivitní maximum je spojeno s nárůstem biomasy, ale tyto enzymy byly velice labilní, přičemž aktivita naměřená v 168. hodině kultivace byla rovna nule. Po přepočtení enzymové aktivity na počet buněk v 1 ml média byl získán graf zobrazený na Obrázku 19, kde je vidět, že k výraznějšímu vyloučení polygalakturonáz došlo pouze ve 24. hodině kultivace.



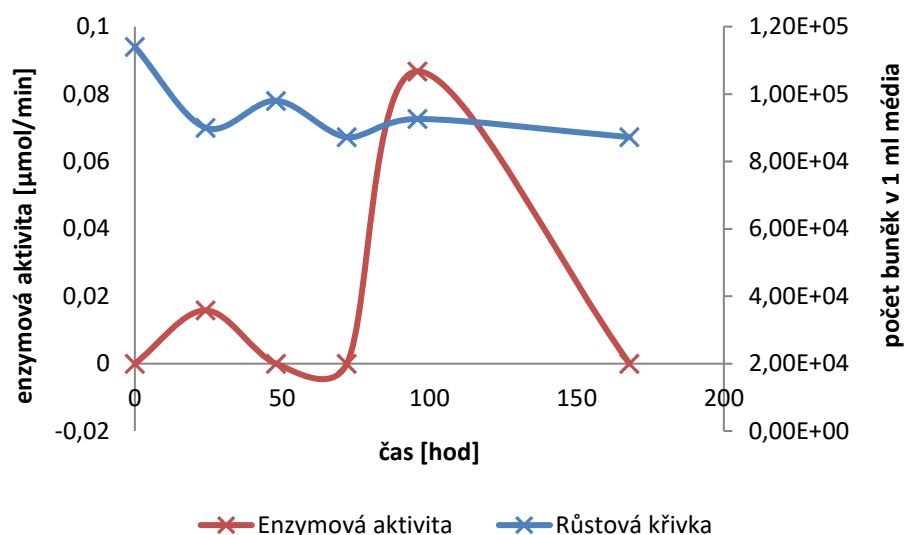
Obrázek 18: Růstové a aktivní křivky kmene *Tr. asahii* CCY 30-19-1 během 168 hodinové kultivace na pektinovém médiu



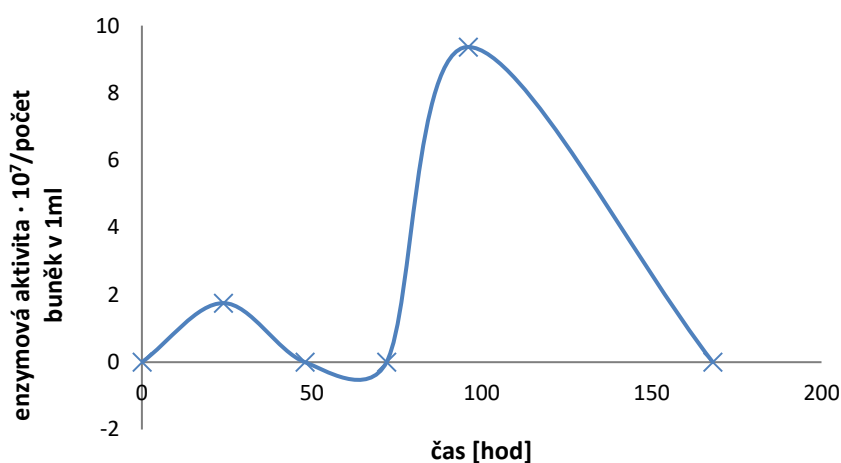
Obrázek 19: Enzymová aktivita polygalakturonáz kmene *Tr. asahii* CCY 30-19-1 přepočtená na počet buněk v 1 ml média

Tausonia pullulans

Tausonia pullulans kmen CCY 30-1-15 byl slabým producentem extracelulárních polygalakturonáz. Jak je vidět na Obrázku 20, kmen na pektinovém médiu v průběhu 168 hodin nevykazoval žádný růst a koncentrace buněk byla po celou dobu kultivace téměř konstatní. Produkce extracelulárních polygalakturonáz byla stejně jako u *Tr. asahii* CCY 30-19-1 dvoufázová, s aktivními vrcholy ve stejném časovém intervalu. Po přepočtu enzymové aktivity na biomasu (Obrázek 21) byly zaznamenány rovněž dva aktivní píky, a to ve 24. a v 96. hodině kultivace, jinak byla aktivita polygalakturonáz nulová. Přestože aktivita tohoto kmene byla slabá, byla prokázána i v rámci screeningu (Příloha) a jako producent polygalakturonáz byla *Tausonia pullulans* označena i v jiných publikacích, např. [60], [63], [68].



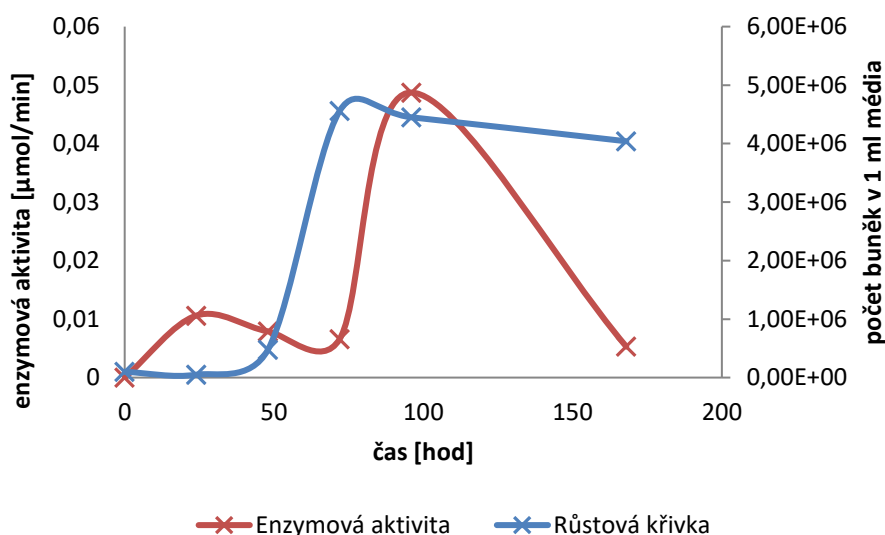
Obrázek 20: Růstová a aktivní křivka kmene *Tausionia pullulans* CCY 30-1-15 během 168 hodinové kultivace na pektinovém médiu



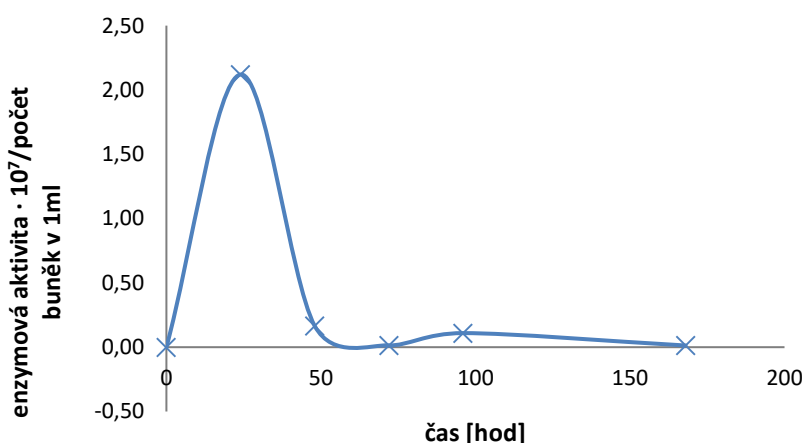
Obrázek 21: Enzymová aktivita polygalakturonáz kmene *Tausionia pullulans* CCY 30-1-15 přepočtená na počet buněk v 1 ml média

***Galactomyces pseudocandidus* CCY 16-3-1**

Kmen CCY 16-3-1 po 48 hodinové adaptační fázi vykazoval dobrý růst a koncentrace buněk se po zbytek kultivace pohybovala kolem $4 \cdot 10^6$ buněk·ml⁻¹ média (Obrázek 22). Produkce polygalakturonáz byla opět dvoufázová, s tím, že nejvyšší enzymová aktivita byla naměřena po 98 hodinách kultivace, ale v průběhu další kultivace klesla na nulu (Obrázek 22). Z Obrázku 23 je patrné, že při přepočtu aktivity enzymu na koncentraci buněk v médiu bylo maxima aktivity polygalakturonáz dosaženo ve 24. hodině kultivace a poté již byla aktivita téměř nulová.



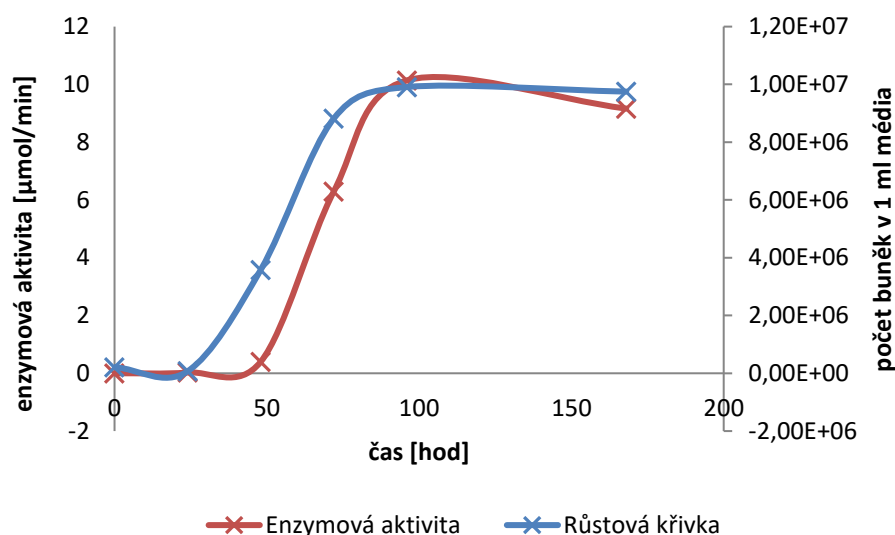
Obrázek 22: Růstová a aktivní křivka kmene *G. pseudocandidus* CCY 16-3-1 během 168 hodinové kultivace na pektinovém médiu



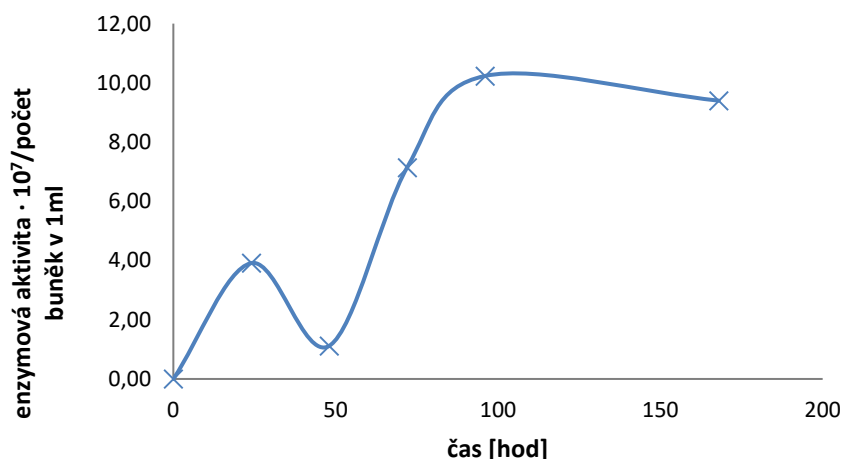
Obrázek 23: Enzymová aktivita polygalakturonáz kmene *G. pseudocandidus* CCY 16-3-1 přepočtená na počet buněk v 1 ml média

Galactomyces candidum CCY 16-3-2

Z Obrázku 24 je patrné, že *G. candidum* kmen CCY 16-3-2 vykazoval oproti ostatním pouze 24 hodinovou adaptační fázi a následně velmi dobře rostl, takže mu pektinové médium jako zdroj uhlíku vyhovovalo. Růstové křivce odpovídá také trend křivky produkce polygalakturonáz, z něž je patrné, že produkce tohoto enzymu je spjata s exponenciální fází růstu kvasinky. Ve stacionární fázi již byly hodnoty naměřených aktivit téměř konstantní. Na Obrázku 25 je patrný počátek produkce polygalakturonázové aktivity ve 24. hodině a od té doby byla polygalakturonázová aktivita udržena po celou dobu kultivace. *G. candidum* CCY 16-3-2 se v průběhu testování jevil jako velkoproducent polygalakturonáz, dosahoval z testovaných *Galactomyces* nejvyšších hodnot aktivity a produkován polygalakturonázy se zdály být poměrně stabilní. Pro možné technologické využití by bylo vhodné enzymy blíže charakterizovat.



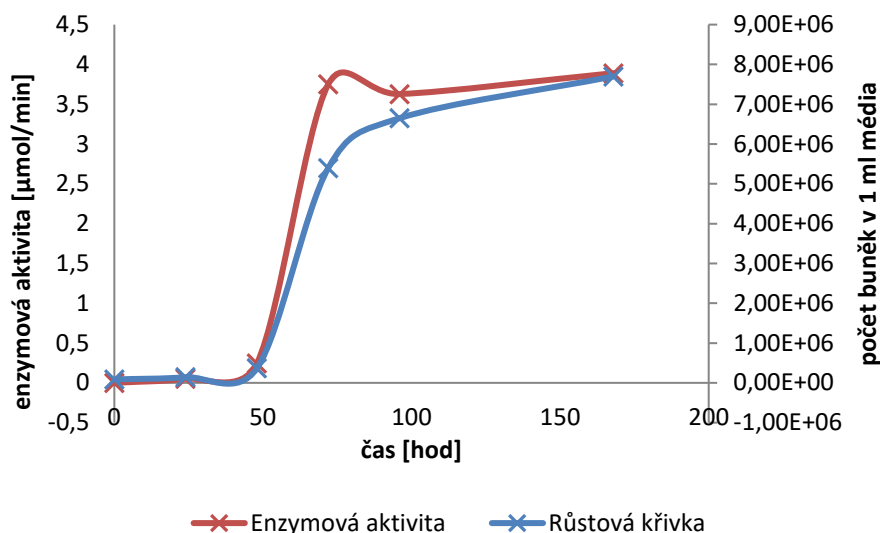
Obrázek 24: Růstová a aktivní křivka kmene *G. candidum* CCY 16-3-2 během 168 hodinové kultivace na pektinovém médiu



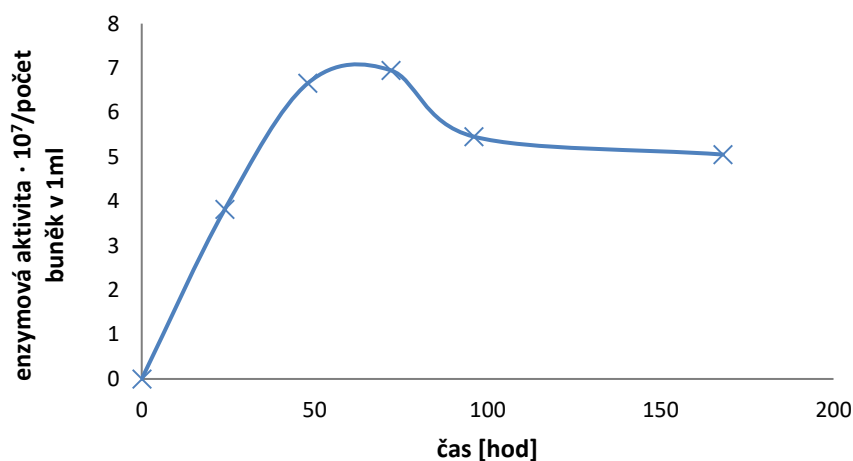
Obrázek 25: Enzymová aktivita polygalakturonáz kmene *G. candidum* CCY 16-3-2 přepočtená na počet buněk v 1 ml média

***Galactomyces candidum* CCY 16-3-4**

Na Obrázku 26 je znázorněna aktivní a růstová křivka pro kmen *G. candidum* CCY 16-3-4. Kmen po 48 hodinové adaptační fázi vykazoval kratší exponenciální fázi a již po 72 hodinách kultivace přešel do stacionární fáze. Společně s růstem docházelo také k produkci extracelulárních polygalakturonáz, jejichž nejvyšší aktivita byla naměřena právě na konci exponenciální fáze. Po přepočtu enzymové aktivity na biomasu (Obrázek 27) je patrné, že extracelulární polygalakturonázy byly aktivní po celou dobu kultivace. *G. candidum* CCY 16-3-4 je dobrým producentem polygalakturonáz, což se potvrdilo již během screeningu.



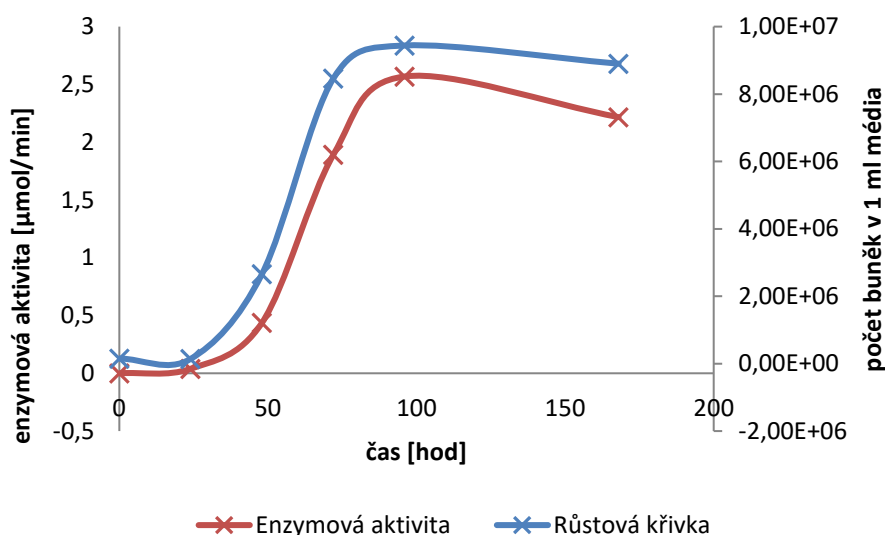
Obrázek 26: Růstová a aktivní křivka kmene *G. candidum* CCY 16-3-4 během 168 hodinové kultivace na pektinovém médiu



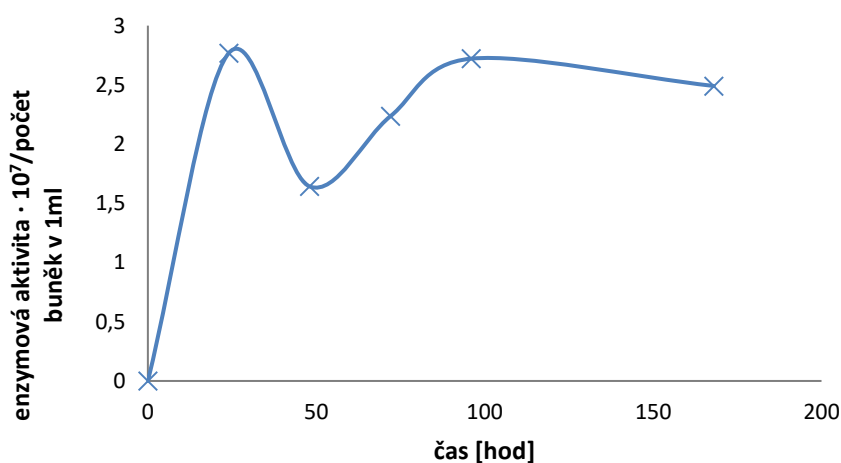
Obrázek 27: Enzymová aktivita polygalakturonáz kmene *G. candidum* CCY 16-3-4 přepočtená na počet buněk v 1 ml média

***Galactomyces candidum* CCY 16-3-6**

Kmen *G. candidum* CCY 16-3-6 vykazoval pouze 24 hodinovou adaptační fázi (Obrázek 28), po níž došlo k rychlému nárůstu koncentrace buněk v médiu, která byla zároveň nejvyšší ze všech testovaných *G. candidum*. Produkce extracelulárních polygalakturonáz koreluje s růstovou křivkou daného kmene a nejvyšší hodnota enzymové aktivity byla naměřena na konci exponenciální fáze. Skutečnost, že extracelulární polygalakturonázy byly aktivní po celou dobu kultivace dokazuje i graf na Obrázku 29. Kmen *G. candidum* CCY 16-3-6 se jeví také jako dobrý producent extracelulárních polygalakturonáz, které by však bylo vhodné blíže charakterizovat.



Obrázek 28: Růstová a aktivní křivka kmene *G. candidum* CCY 16-3-6 během 168 hodinové kultivace na pektinovém médiu



Obrázek 29: Enzymová aktivita polygalakturonáz kmene *G. candidum* CCY 16-3-6 přepočtená na počet buněk v 1 ml média

Produkce polygalakturonáz kvasinkami *G. candidum* se jeví jako vnitrodruhová vlastnost, protože všichni testovaní zástupci měli v rámci screeningu i při týdenním pozorování pozitivní výsledky. Intenzita produkce se ale mezi jednotlivými kmeny liší, takže pro případnou průmyslovou produkci je třeba vybrat vhodný kmen a charakterizovat jím produkované polygalakturonázy, jako tomu bylo i v práci Jägera [84].

5.2.2 Lipázová aktivita

Lipázová aktivita byla u všech vybraných kvasinek testována jako schopnost hydrolyzovat médium obsahující Tween 80. Produkce lipáz je na médiu prokázána vznikem čiré zóny v okolí kolonie kvasinky (Obrázek 30).

Tween 80 je z více jak 58 % procent tvořen mastnými kyselinami, především linolovou, palmitovou a stearovou [87], takže schopnost kvasinek štěpit toto médium odráží schopnost využít v přírodě mastné kyseliny jako substrát. Obdobné složení mastných kyselin tvoří

i povrchové hydrofóbní vrstvy rostlinných materiálů, zejména listů, které se po opadu stávají uhlíkatým zdrojem pro půdní mikroorganismy [88]. Ke stejnému závěru došla také Molnárová a kol. [57], v jejíž práci exhibovalo lipolytickou aktivitu více jak 50 % testovaných kvasinek, které byly ve většině případů izolovány z listů rostlin.



Obrázek 30: Důkaz produkce lipáz vytvořením čiré zóny v médiu s Tween 80. Testovaná kvasinka *A. pullulans*, kmen 199

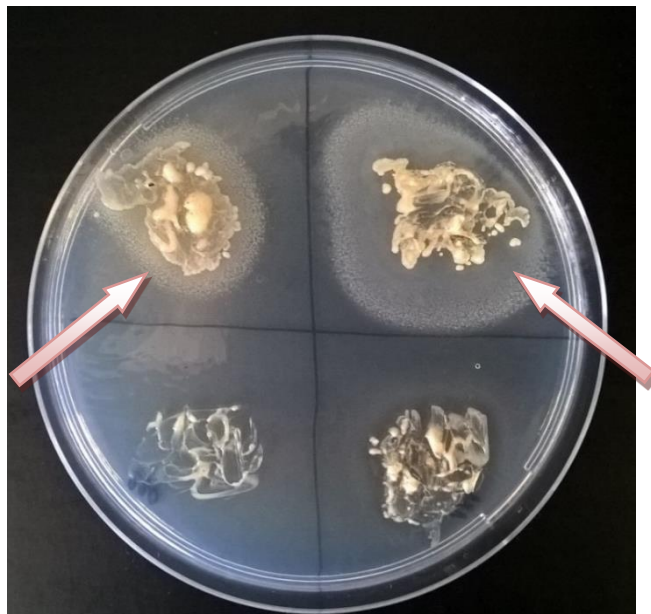
Pozitivní lipolytická enzymová aktivita byla v rámci experimentu stanovena pro 29 zástupců kvasinek náležícím k 17 různým druhům. Produkce lipáz byla mírně vyšší u kvasinek izolovaných z ovocných půd, exhibovalo ji 45 %, kdežto v případě izolátu z kontaminovaných půd to bylo 30 % kvasinek. Mezi největší producenty této aktivity patří *A. pullulans*, *Cys. macerans*, *Apiotrichum porosum* a *Tausonia pullulans*. Lipázová aktivita byla u rodu *Trichosporon* pozorována také podle Vakhlu [60]. Na druhou stranu byli v téže publikaci druh *G. candidum* a rod *Candida* označeni za komerční producenty lipáz, ale v rámci tohoto experimentu tuto aktivitu neexhiboval ani jeden z kmenů, takže tuto vlastnost nelze považovat za druhovou a už vůbec ne za rodovou. Producentem lipáz byla také kvasinka *Barnettozyma californica*, která se i podle Kurtzman [19] díky této aktivitě podílí na zkáze rostlinných olejů. I v tomto případě se ale jedná o kmenovou závislost (Příloha).

5.2.3 Proteázová aktivita

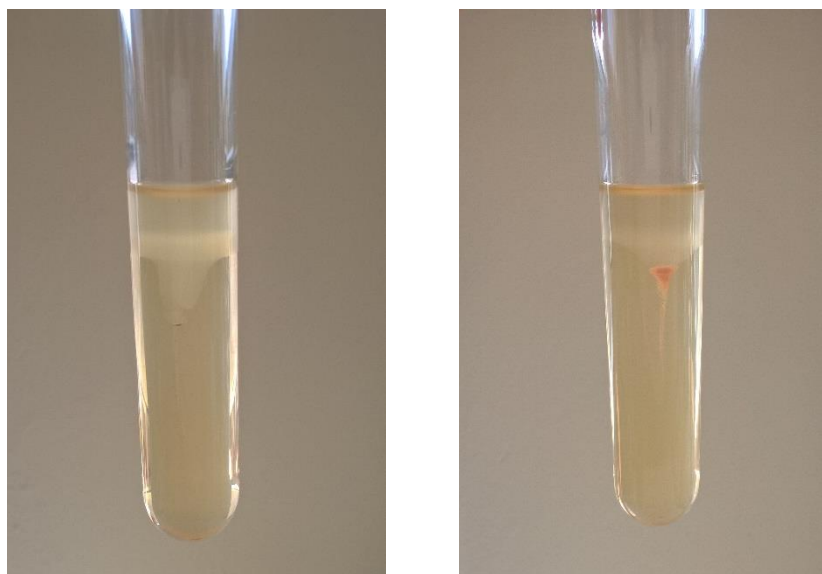
V rámci experimentu byla proteolytická aktivita testována na Skim milk médiu a na želatině. Pozitivní výsledek štěpení Skim milk média se projevil vznikem bílé zóny okolo kolonie (Obrázek 31) a pokud mikroorganismus hydrolyzoval želatinu, došlo k jejímu ztekucení (Obrázek 32).

Proteázy jsou skupina enzymů, které katalyzují štěpení proteinů na peptidy, popřípadě až na aminokyseliny. Proteiny jsou obsaženy v buněčných stěnách rostlin a brání tak mikrobiálnímu ataku. S ohledem na přítomnost tlejícího organického materiálu v půdě se jeví tento enzymatický aparát pro půdní organismy jako nezbytný. Jednotlivé proteázy se od sebe liší

svými vlastnostmi, strukturou i specificitou účinku, a proto, jak výsledky naznačují, kvasinky, které byly schopné hydrolyzovat Skim milk, ne vždy hydrolyzovaly také želatinu.



Obrázek 31: Důkaz produkce proteáz vytvořením bílé zóny v médiu se Skim milk. Pozitivní *Goffeauzyma gastrica* kmen 181 (vlevo) a *Holtermanniella* kmen 185 (vpravo)



Obrázek 32: Důkaz produkce proteáz ztekucením želatiny. Kmen *Rh.vanilica* 172 (vlevo) a *Cys. macerans* 140 (vpravo)

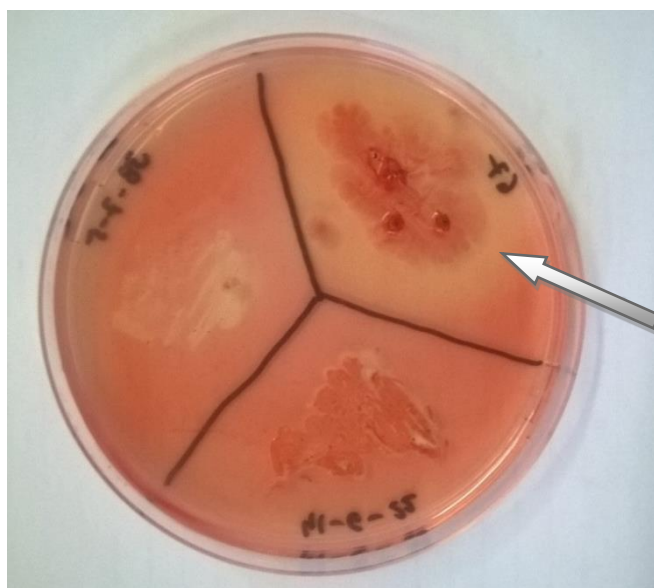
Celkem byla proteolytická aktivita pozorována u 18 kmenů kvasinek, náležících ke třinácti druhům (Obrázek 17). Téměř dvakrát častěji kvasinky produkovaly proteázy štěpící Skim milk (18 kmenů) než želatinu (10 kmenů) a všechny kmeny, které hydrolyzovaly želatinu, hydrolyzovaly také Skim milk. Většina kvasinek produkujících proteázy byla izolována z půd pod ovocnými stromy, z kontaminovaných půd exhiboval proteázy pouze *Cr. musci* na Skim milk médiu. Největšími producenty byly opět kmeny *A. pullulans*, *Cys. macerans* a *Tausonia*

pullulans, jejichž proteázy ztekucovaly želatinu i štěpily Skim milk. *A. pullulans* izolovaný z ovocných stromů produkoval proteázy také v obou médiích [57]. Kmen *Leucosporidium scottii* (165) exhiboval během screeningu proteolytickou aktivitu na obou médiích a tato aktivita u něj byla pozorována i v případě kmenů izolovaných na Antarktidě [27].

U testovaných kvasinek byly pozorovány velké rozdíly mezi jednotlivými druhy, např. zatímco kmeny *Cys. macerans* produkovaly proteázy u všech testovaných kmenů na obou médiích, *Cys. infirmominiatum* a *Cys. capitatum* neexhibovali ani jednu aktivitu. *M. pulcherrima*, *D. hansenii* a *S. cerevisiae* izolované z ovocných stromů ztekucovaly želatinu [57], v případě ovocných půd ale nevykazovaly aktivitu ani na jednom médiu. Naopak *Rh. glutinis* izolovaná z ovocných stromů neměla žádnou proteolytickou aktivitu [57], ale během tohoto screeningu produkovaly všechny druhy *Rhodotorula* proteázy na Skim milk.

5.2.4 Celulázová aktivita

Celulázová aktivita produkovaná kvasinkami byla testována na miskách s médiem obsahujícím karboxymethylcelulózu (CMC). Metoda je založena na barvení neporušených β -(1-4)-D-glukosidických vazeb Kongo červení. V místech, kde bylo médium celulázami naštěpeno na monomerní glukózu, vzniká jasná žlutá zóna (Obrázek 33).



Obrázek 33: Důkaz produkce celuláz vznikem jasné zóny v okolí kolonie kvasinky. Pozitivní výsledek pro *Tausonia pullulans*, kmen CCY 30-1-15

Celulázový enzymový aparát je pro půdní mikroorganismy důležitý kvůli zpracování lignocelulózových a hemicelulózových komponent organického odpadu. Přes tento fakt překvapivě exhibovalo celulázovou aktivitu pouze 9 kmenů kvasinek, přičemž každý patřil jinému druhu. Všechny kvasinky produkující celulázy byly izolovány z půd pod ovocnými stromy.

Celulázová aktivita byla pozorována u *A. pullulans* (CCY 27-1-134), *Cys. macerans* (123), *M. pulcherrima* (157), *Rh. pustula* (117), *Saccharomycopsis crataegensis* (115), *Tr. akiyoshidainum* (70), *Apiotrichum dulcitum* (69), *Apiotrichum porosum* (61), *Tausonia*

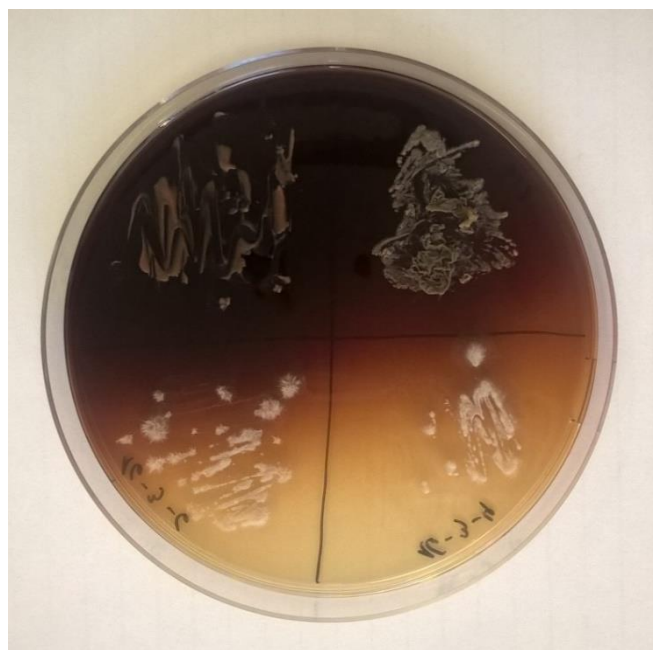
pullulans (CCY 30-1-15). Produkce celuláz u rodu *Trichosporon* byla zaznamenána i v publikaci Thongekkaewa [68].

Podle publikací Thongekkaewa [68] a Strausse [83] byla očekávaná celulólytická aktivita u kvasinek rodu *Candida*, která však v rámci screeningu nebyla potvrzena. Thongekkaew také uvádí, že o celulázách produkovaných rodem *Candida* bylo zatím publikováno málo výsledků a sbírky kvasinek je pro tuto aktivitu třeba dotestovat [68].

Pro přesnější potvrzení produkce celuláz by bylo vhodnější použít stanovení aktivity těchto enzymů v médiu podle Somogyi-Nelsona, protože vznik jasné zóny na médiu s CMC v okolí kmene nebyl vždy jednoznačný.

5.2.5 β -glukosidázová aktivita

β -glukosidázová aktivita byla stanovena testem štěpení arbutinu. Arbutin je přírodní fenolický β -glukosid nacházející se v rostlinách. V případě, kdy mikroorganismus produkuje β -glukosidázy, dochází jejich účinkem k rozštěpení arbutinu na β -D-glukózu a hydroxychinon. Hydroxychinon poté reaguje s jakoukoli přítomnou železitou solí, v důsledku čehož se médium zbarví hnědě (Obrázek 34) [19].



Obrázek 34: Důkaz produkce β -glukosidáz vznikem hnědé skvrny okolo kolonie. Pozitivní testy u kmene *Cys. capitatum* HI'a.2 (vlevo) a *A. pullulans* 199 (vpravo)

Kvasinky produkují β -glukosidázy, které se od sebe mohou lišit substrátovou specificitou, kvantitou a také mohou být produkovány v různých časových intervalech kultivace. Jeden druh kvasinky je pak zpravidla schopen produkce pouze jednoho druhu β -glukosidáz, takže štěpí-li kvasinka arbutin, nemusí být aktivní na salicinu [89].

V rámci provedeného screeningu byla β -glukosidázová aktivita vůbec nejčastěji produkovanou aktivitou (Obrázek 17), pozitivních bylo při štěpení arbutinu celkem 55 % kvasinek, což odpovídá 38 kmenům patřícím k 25 druhům kvasinek. β -glukosidázy produkovaly ve velkém množství zástupců (více jak 70 %) také kvasinky izolované z listů ovocných stromů [57]. Arbutin štěpily všechny kvasinky izolované z kontaminovaných půd

s výjimkou *Tr. akioshidanium* CCY 5-2-1. Kvasinky izolované z půdy pod ovocnými stromy pak měly tuto aktivitu asi v polovině případů.

Mezi největší producenty patří *Apiotrichum porosum* a *Tausonia pullulans*, jejichž všechny kmeny produkovaly β -glukosidázu. *Trichosporon asahii* je podle Wanga komerčním producentem β -glukosidáz používaných k dotvoření flavouru vín Cabernet Sauvignon [82]. V rámci screeningu však aktivitu exhiboval pouze jeden kmen (Příloha) ze dvou testovaných.

Pozitivní v rámci screeningu byly všechny testované kmeny rodu *Candida*, *Cryptococcus* a *Aureobasidium* (Příloha). Stejných výsledků bylo dosaženo při screeningu aktivit kvasinek z ovocných stromů [57], vinných kvasinek [66] a také podle McMahony při testování non-*Saccharomycet* ve vinařském průmyslu [90]. Podle Barnetta je ale produkce β -glukosidáz u kvasinek rodu *Candida* diskutabilní a závislá na kmeni [89], což se stalo např. v případě *Candida oleophila*, která v rámci tohoto screeningu byla pozitivním producentem, ale podle Strausse nikoli [83]. Dalšími producenty byli zástupci druhu *Cyberlindnera saturnus*, *Cyberlindnera suaveolens*, *Cys. macerans*, *Cys. capitatum*, *Rh. pustula* a *Rh. glutinis*. *Rhodotorula* byly aktivními producenty i při testování Barnettem [89]. Stejný autor uvádí jako producenty β -glukosidáz rod *Pichia*, Molnárová a kol. popisuje jako producenty druh *Hanseniaspora uvarum* [57], Fia a také McMahon přidávají ještě zástupce *Metschnikowia pulcherrima* a *Torulaspora delbrueckii* [66, 90]. Všichni jmenovaní byli ale v rámci screeningu půdních kvasinek negativní, což opět poukazuje na kmenové závislosti v schopnosti produkce enzymů.

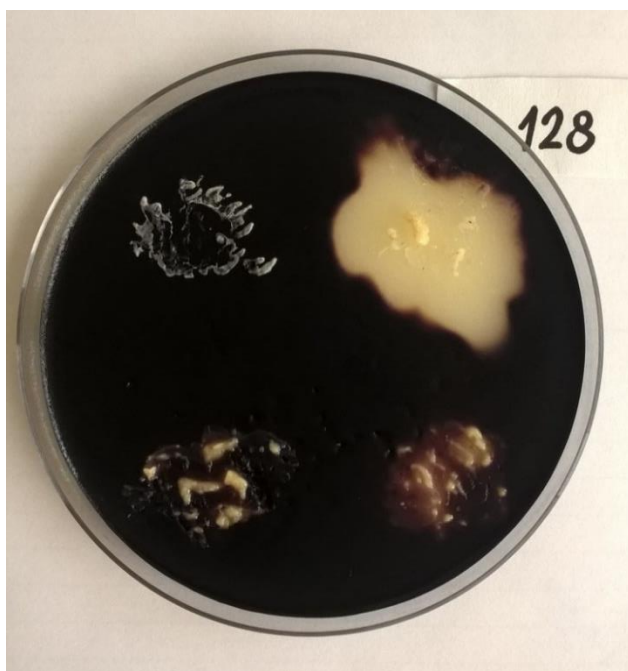
Z výsledků vyplývá, že arbutin jsou schopné štěpit převážně non-*Saccharomycety*, což uvádí také Molnárová a kol. [57], Barnett [89] a také Strauss [83]. Podle Barnetta ale v případě testování kvasinek na arbutinu dochází ke vzniku mylných výsledků, převážně právě u kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Uvádí, že v mnoha případech byly testy pozitivní, ale při analýze zhnědlého média nebyl nalezen žádný naštěpený hydroxychinon, který by poukazoval na produkci β -glukosidáz [89].

5.2.6 α -amylázová aktivita

α -amylázy jsou hydrolytické enzymy schopné štěpit škrob na dextrin a jednodušší cukry. V rámci screeningu byly pro detekci α -amylázové aktivity využity Petriho misky se škrobovým médiem, které se na konci kultivace zalévaly Lugolovým roztokem. Jak je vidět na Obrázku 35, v případě pozitivního testu produkce α -amyláz došlo k vytvoření světlé zóny okolo kvasinky, zatímco nepoškozený škrob zůstal zbarven tmavě modře.

Škrob je zásobním polysacharidem rostlin, v jejichž orgánech se ukládá v podobě škrobových zrn. Spolu s tlejícími zbytky rostlin se dostávají do půdy i tato škrobová zrna a mohou představovat zdroj uhlíku pro přítomné mikroorganismy. Pro jeho štěpení je nezbytný amylolytický aparát, složený zpravidla z α -amylázy, β -amylázy, glucoamylázy a pullulanázy. Průmyslově se schopnost produkce těchto enzymů využívá především u plísní a bakterií, ale byly studovány i některé kvasinky [63].

V rámci screeningu bylo pozorováno celkem 18 kmenů kvasinek náležících k 14 druhům, které štěpily škrob. Všichni producenti α -amyláz byli izolováni z půd pod ovocnými stromy, což nasvědčuje tomu, že právě v takovémto prostředí, bohatém na škrobnaté sloučeniny, je amylolytický enzymový aparát u kvasinek častější, než v půdách kontaminovaných s minimem organických substrátů.



Obrázek 35: Důkaz produkce α -amyláz vznikem čiré zóny v okolí kolonie. Pozitivní kmen *Tr. laibachii* č. 128

α -amylázy produkovaly všechny testované kmeny rodu *Cryptococcus* s výjimkou kmene *Cr. musci* CCY 17-26-1, který byl jako jediný izolován z kontaminované půdy. Stejná závislost byla pozorována u testovaných kmenů rodu *Trichosporon*, kde s výjimkou druhu *Apiotrichum dulcitum*, všichni produkovali α -amylázy. Produkce α -amyláz byla jako společná vlastnost pozorována u rodů *Cryptococcus* a *Trichosporon* i při screeningu amylolytických kvasinek v roce 2016, Djekrif a kol. [63]. Dalšími producenty byli *A. pullulans* (CCY 27-1-134, 199), *Cys. macerans* (kmen 123), *Rh. vanilica* a *Sporidiobolus metaroseus*. *A. pullulans* jako producent α -amyláz byl pozorován také Djekrifem a kol. [63]. Stejný autor pak uvádí jako potenciální producenty rody *Pichia*, *Candida*, *Schwanniomyces* a druh *Saccharomyces cerevisiae*. Ani jeden ze jmenovaných ale v rámci screeningu α -amylázovou aktivitu neexhiboval.

Strauss, který testoval vinné kvasinky, shledal jako negativní při testování rody *Candida* a *Debaryomyces* [83]. Stejných výsledků bylo dosaženo i v rámci tohoto screeningu. Žádný jiný producent α -amyláz nebyl pozorován, což koreluje s dalšími výsledky testování vinných kvasinek, kdy amylolytickou aktivitu neprodukovala ani jedna z testovaných [91]. Djekrif také uvádí, že produkci α -amyláz může ve velké míře ovlivňovat složení kultivačního média [63].

5.2.7 Chitinázová aktivita

Chitin je přírodní lineární polymer, jehož monomerem je N-acetylglukosamin, který je ve struktuře pojen β -1,4 vazbami. Chitin je nerozpustný a tvoří tak ochranné vrstvy těl mikroorganismů, hub, řas, hmyzu i dalších živočichů. Pro jeho rozklad je třeba skupina chitinolytických enzymů. Zejména plísňe a bakterie schopné produkce chitináz se pak uplatňují jako biokontroloři při prevenci různých posklizňových chorob ovoce [92].

Produkce chitináz byla v rámci screeningu testována jako nárůst volných redukujících skupin Somogyi-Nelsonovou reakcí a paralelně také jako nárůst uvolněných N-acetyl-D-glukosaminových jednotek Ehrlichovou reakcí. Výsledky získané Ehrlichovou reakcí vůbec nekorespondovaly s výsledky testování 14 kmenů miskovou metodou využívající bromkresolovou červen, proto byla misková metoda pro další práci vyloučena. Pomocí Somogyi-Nelsonova testu nebyla chitináza spolehlivě detekována ani u jednoho zástupce. Ehrlichova metoda detekovala 9 kmenů, které produkovaly chitinázy. Celková chitinolytická aktivita kvasinek byla slabá (13 %), stejně jako tomu bylo v případě screeningu kvasinek z tropického, subglaciárního a arktického prostředí [56, 93, 94]. Jednalo se převážně o zástupce rodu *Trichosporon*, chitinázy produkovaly všechny kmeny kromě druhu *Apiotrichum porosum*. Dalšími producenty byli *Cr. musci* CCY 17-26-1, jeden kmen *A. pullulans* CCY 27-1-134 a *Sporidiobolus metaroseus*. Buzzini a Martini ve své studii zaznamenali také jako producenty chitináz druh *A. pullulans* a zástupce rodu *Cryptococcus* [56].

Jak je patrné z Obrázku 17, producenty chitináz byly kmeny, které ostatní aktivity příliš neexhibovaly. Pouze dva izoláty *Cr. musci* CCY 17-26-1 a *Tr. akiyoshidainum* CCY 5-2-1, stejně jako v případě produkce škrobu podobných polysacharidů, pocházely z kontaminované půdy.

Podle některých zdrojů [76] by chitinolyticky aktivní měla být *S. cerevisiae*. To se ale nepotvrdilo ani v případě tohoto screeningu, ani v případě izolátů z tropických oblastí [56]. Srovnatelné výsledky se screeningem tropických kvasinek byly dosaženy při testování aktivity druhů *Debaryomyces hansenii*, *Haniaspora uvarum*, *Pichia kluyveri*, *Torulaspora delbrueckii* a *Rhodotorula glutinis*, u kterých také nebyla prokázána produkce chitináz [56].

5.2.8 Produkce škrobu podobných polysacharidů

Škrob je přírodní polysacharid, jehož strukturu tvoří dvě základní komponenty, amylopektin a amyulóza. Škrob si organismy syntetizují jako zásobní látku, kterou ukládají v podobě granulí ve svých buněčných stěnách. Důkazová reakce se provádí pomocí jódu, který se škrobem tvoří tmavě modré zbarvení [95]. Během screeningu byl pro detekci použit Lugolův roztok, kterým byly zality Petriho misky s naočkovanými kvasinkami. Z Obrázku 36 je patrné, že kvasinky produkující škrob zmodraly, naopak kvasinky bez této schopnosti zůstaly neobarveny s jasnou zónou okolo sebe.

Monomerní jednotkou škrobu je glukóza a enzymový aparát, který je schopen tyto monomery pojit až na samotný škrob, nebyl ještě u mikroorganismů zcela úplně popsán. Schopnost produkce škrobu byla pozorována u rostlin, řas, plísní a některých kvasinek [96].

V rámci testování na produkci škrobu podobných polysacharidů byly pozitivní pouze tři rody kvasinek, *Cryptococcus*, *Cystofilobasidium* a *Trichosporon*, jejichž zástupci tvoří 13 druhů a dále 21 kmenů. Největším producentem byly druhy *Cys. macerans*, *Cys. capitatum* a *Cys. infirmominiatum*, jejichž všechny kmeny produkovaly škrobu podobné látky.

Zástupci rodu *Cryptococcus* tvořili škrobové polysacharidy s výjimkou dvou kmenů *Holtermanniella takashimae* 220 a *Saitozyma podzolica* 210. Rod *Trichosporon* produkoval škrobu podobné polysacharidy u všech testovaných zástupců s výjimkou druhu *Apiotrichum porosum* a jednoho kmene *Tr. asahii* 11. Schopnost produkce škrobu podobných polysacharidů byla pozorována také Schultzem u druhu *Cr. laurentii* [97].



Obrázek 36.: Důkaz produkce škrobu kvasinkami vznikem tmavě modrého zbarvení. Pozitivní kmen *Cys. capitatum* 177 (vlevo nahoře) a *Cys. macerans* 145 (vpravo dole)

Pouze dva kmeny, *Cr. musci* CCY 17-26-1 a *Tr. akiyoshidainum* CCY 5-2-1, byly zástupci kontaminovaných půd, ostatní kvasinky tvořící škrobu podobné polysacharidy byly získány z půdy pod ovocnými stromy.

V devíti případech byla pozorována korelace produkce škrobu podobných látek s tvorbou α -amyláz, která poukazuje na schopnost syntézy a možného znovuvyužití zásobních škrobových zrn kvasinkami. Nejčastěji tvořili škrobu podobné polysacharidy a zároveň produkovali α -amylázy zástupci rodu *Cryptococcus*.

A. pullulans izolovaný z mořské vody byl vybrán jako producent škrobu podobných látek s možným průmyslovým využitím skupinou vědců Li, Chi a kol. [98]. V rámci screeningu ale nebyl pozitivní ani jeden z testovaných kmenů. Screening vinných kvasinek [83] vyhodnotil zástupce *C. oleophila* a *Pichia kluyveri* jako producenty škrobu a obdobně je kvasinka *S. cerevisiae* vybírána jako modelový organismus pro testování produkce škrobových polysacharidů v průmyslovém měřítku [95, 96]. V předložené práci producentem nebyl ani jeden ze jmenovaných, což opět poukazuje na kmenovou závislost v podobnosti metabolismu a produkci enzymů u kvasinek.

6 ZÁVĚR

Pro screening enzymových aktivit bylo vybráno celkem 68 zástupců půdních kvasinek, které náležely k 45 druhům. Kvasinky podrobené testům byly izolovány z půd nacházejících se pod ovocnými stromy jihozápadního Slovenska (58) a kontaminovaných půd oblasti Pernek (10), Slovensko. Kvasinky byly testovány na produkci následujících extracelulárních enzymů: polygalakturonázy, proteázy, β -glukosidázy, lipázy, celulázy, α -amylázy, chitinázy a na produkci škrobu podobných polysacharidů.

Více než 75 % testovaných kvasinek produkovalo alespoň jednu extracelulární enzymovou aktivitu, přičemž kvasinky izolované z půd pod ovocnými stromy měly širší spektrum produkovaných enzymů než kvasinky pocházející z kontaminovaných půd. Nejčastěji produkovanými enzymy byly lipázy, proteázy a β -glukosidázy, naopak méně často byla pozorována produkce celuláz a chitináz. Deset kmenů kvasinek nebylo pozitivních pro žádnou z testovaných extracelulárních enzymových aktivit.

Největším producentem extracelulárních enzymových aktivit byl *Aureobasidium pullulans*, CCY 27-1-134, který exhiboval všechny z testovaných aktivit, ale neprodukoval škrobu podobné polysacharidy.

Tausonia pullulans byl dalším významným producentem enzymů, při testování exhiboval polygalakturonázovou, lipázovou, proteázovou, β -glukosidázovou i α -amylázovou aktivitu a také produkoval škrobu podobné látky. Srovnatelně aktivní v produkci polygalakturonáz a lipáz byl rod *Cystofilobasidium*, navíc *Cys. macerans* vnitrodruhově exhibovali proteázy. Rod *Cryptococcus* produkoval nejčastěji lipázy, β -glukosidázy, α -amylázy a také škrobu podobné látky, ale produkce se u jednotlivých druhů lišila. Všechny kmeny rodu *Galactomyces* byly pozitivní pro β -glukosidázy, stejně jako jím byly kmeny rodů *Candida* a *Cyberlindnera*.

Polygalakturonázová aktivita byla produkována u 38 % testovaných kmenů, největšími producenty byli *A. pullulans*, *Cys. macerans* a rod *Galactomyces*. Pro vybrané kmeny byl průběh produkce polygalakturonáz pozorován po dobu 168 hodin v závislosti na schopnosti růstu na pektinovém médiu. Jako největší producenti polygalakturonáz byly vyhodnoceny kmeny *G. candidum* CCY 16-3-2 a CCY 16-3-4, kteří rovněž vykazovaly velmi dobrý a stabilní růst na pektinu. Lipázová aktivita determinovaná štěpením Tweenu 80 byla pozorována u 41 % testovaných, přičemž nejvíce aktivní byli *A. pullulans*, *Cys. macerans* a *Apiotrichum porosum*. Proteázová aktivita byla testována štěpením Skim milk a ztekucováním želatiny. Schopnost štěpení Skim milk prokázalo 26 % zástupců, zatímco pouze 14 % testovaných ztekucovalo želatinu. Všechny kmeny, které ztekucovaly želatinu, štěpily také Skim milk a nejaktivnější byly druhy *A. pullulans*, *Cys. macerans* a *Tausonia pullulans*. Shodně pouze 13 % kmenů kvasinek produkovalo celulázy a chitinázy, ale korelace v produkci těchto enzymů byla pozorována pouze u *A. pullulans*, *Tr. akiyoshidanium* a *Apiotrichum dulcitum*. β -glukosidázy byly vůbec nejčastěji exhibovaným enzymem, a to z 55 %. Největším producentem byli *Apiotrichum porosum*, *Tausonia pullulans*, *Cys. macerans*. Pozitivní při produkci byly také všechny kmeny rodu *Candida*, *Cryptococcus* a *Aureobasidium*. Produkce α -amyláz byla pozorována u 26 % kmenů, nejvíce produkovaly tento enzym kmeny rodu *Trichosporon* a *Cryptococcus* a dále někteří zástupci rodu *Aureobasidium*, *Cystofilobasidium* a *Rhodotorula*. Naopak produkce škrobu podobných polysacharidů byla zaznamenána u 31 % testovaných,

přičemž v případě devíti kmenů produkce škrobových polysacharidů korelovala s produkcí α -amyláz. Producenty škrobu podobných polysacharidů byli pouze zástupci rodů *Cryptococcus*, *Cystofilobasidium* a *Trichosporon*.

Výsledky screeningu ukázaly, že produkce extracelulárních enzymů je ve většině případů podmíněna produkčním kmenem a nelze očekávat druhové závislosti v produkci těchto enzymů.

ZDROJE LITERATURY

1. WALL, Diana H. (ed.). *Soil ecology and ecosystem services*. Oxford: Oxford University Press, 2012. ISBN 978-0-19-957592-3.
2. BARDGETT, Richard D., David W. HOPKINS a Michael B. USHER (eds.). *Biological diversity and function in soils*. New York: Cambridge University Press. ISBN 05-218-4709-5.
3. PEPPER, Ian L., Charles P. GERBA a Terry J. GENTRY. *Environmental microbiology*. Third edition. Amsterdam: Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier, 2015. ISBN 01-239-4626-3.
4. Půda a atmosféra. *Vítej na Zemi.: Multimediální ročenka životního prostředí* [online]. Praha: CENIA, česká informační agentura životního prostředí, 2013 [cit. 2016-05-27]. Dostupné z: http://vitejtenazemi.cz/cenia/index.php?p=puda_a_atmosfera&site=puda
5. ŠARAPATKA, B. *Pedologie*. Olomouc: Univerzita Palackého, 1996, 235 s. ISBN 80-7067-590.
6. PROCHÁZKA, Stanislav. *Fyziologie rostlin*. 1. Praha: Academia, 1998, 484 s. ISBN 80-200-0586-2.
7. Ekologie lesa: Sluneční záření. In: *Nauka o lesním prostředí: projekt FRVŠ 2010: 962/2010* [online]. Praha: Ing.Iva Ulbrichová, Ph.D., 2010 [cit. 2016-05-27]. Dostupné z: http://fld.czu.cz/vyzkum/nauka_o_lp/ekologie/ekosystemy.html#zareni
8. KUTTY, Sreedevi N. a Rosamma PHILIP. Marine yeasts—a review. *Yeast*. 2008, **25**(7), 465-483. DOI: 10.1002/yea.1599. ISBN 10.1002/yea.1599. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/yea.1599>
9. ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: ACADEMIA, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
10. HERITAGE, J., E. G. V. EVANS a R. A. KILLINGTON. *Introductory microbiology*. Ilustrované vydání, dotisk. New York: Cambridge University Press, 1996. ISBN 05-214-4977-4.
11. HERNÁNDEZ-ALMANZA, Ayerim, Julio CESAR MONTANEZ, Miguel A. AGUILAR-GONZÁLEZ, Cristian MARTÍNEZ-ÁVILA, Raúl RODRÍGUEZ-HERRERA a Cristóbal N. AGUILAR. Rhodotorula glutinis as source of pigments and metabolites for food industry. *Food Bioscience*. 2014, **5**, 64-72. DOI: 10.1016/j.fbio.2013.11.007. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212429213000849>

12. KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Taxonómia kvasinek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. Bratislava: Vydavateľstvo Alfa, 1990, 699 s., [72] s. obr. príl. Edícia potravinárskej literatúry. ISBN 80-050-0644-6.
13. WALKER, Graeme M. *Yeast physiology and biotechnology*. Ilustrované vydání, dotisk. Chichester: John Wiley & Sons, 1998. ISBN 0471964476
14. SLÁVIKOVÁ, Elena a Renata VADKERTIOVÁ. The diversity of yeasts in the agricultural soil. *Journal of Basic Microbiology*. 2003, **43**(5), 430-436. DOI: 10.1002/jobm.200310277. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jobm.200310277>
15. SANDHU, Dhanwant K. a Manjit K. WARAICH. Yeasts associated with pollinating bees and flower nectar. *Microbial Ecology*. 1985, **11**(1), 51-58. DOI: 10.1007/BF02015108. ISBN 10.1007/BF02015108. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02015108>
16. CONNELL, L., R. REDMAN, S. CRAIG, G. SCORZETTI, M. ISZARD a R. RODRIGUEZ. Diversity of Soil Yeasts Isolated from South Victoria Land, Antarctica. *Microbial Ecology*. 2008, **56**(3), 448-459. DOI: 10.1007/s00248-008-9363-1. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00248-008-9363-1>
17. BOTHA, Alfred. The importance and ecology of yeasts in soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 2011, **43**(1), 1-8. DOI: 10.1016/j.soilbio.2010.10.001. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071710003718>
18. YURKOV, A.M., M. KEMLER a D. BEGEROW. Assessment of yeast diversity in soils under different management regimes. *Fungal Ecology*. 2012, **5**(1), 24-35. DOI: 10.1016/j.funeco.2011.07.004. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1754504811000754>
19. KURTZMAN a JACK W. FELL AND TEUN BOEKHOUT. The yeasts: a taxonomic study. 5th ed. Amsterdam: Elsevier, 2011. ISBN 978-044-4521-491.
20. WUCZKOWSKI, M., et al. Diversity of microfungi and yeasts in soils of the alluvial zone national park along the river Danube downstream of Vienna, Austria (" Nationalpark Donauauen"). *BODENKULTUR-WIEN AND MUNCHEN-*, 2003, 54.2: 109.
21. SLÁVIKOVÁ, Elena a Renata VADKERTIOVÁ. The occurrence of yeasts in the forest soils. *Journal of Basic Microbiology* [online]. Berlin: WILEY-VCH Verlag Berlin GmbH, 0007n. 1., **40**(3), 207-212 [cit. 2016-11-23]. DOI: 10.1002/1521-4028(200007)40:3<207::AID-JOBM207>3.0.CO;2-H. ISSN 0233-111X.
22. SLÁVIKOVÁ, Elena a Renata VADKERTIOVÁ. The occurrence of yeasts in the grass-grow soil. *Czech Mycology*. 2003, **54**(3-4), 238-247.

23. VADKERTIOVÁ, Renáta, Jana MOLNÁROVÁ, Alexander LUX, Marek VACULÍK a Desana LIŠKOVÁ. Yeasts associated with an abandoned mining area in Pernek and their tolerance to different chemical elements. *Folia Microbiologica* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 1605, **61**(3), 199-207 [cit. 2016-11-23]. DOI: 10.1007/s12223-015-0424-9. ISSN 0015-5632.
24. GOLUBEV, Wladyslaw I. a J. S. HARRISON, ROSE, A. H. (ed.). Capsules. The yeasts, 1991, 4.: *The Yeasts*. London: Academic Press, 1991, (4), 175-198.
25. JENSEN, V. Studies on the microflora of Danish beech forest soils. III. Properties and composition of the bacterial flora. *Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkunde (Abteilung II)*, 1963, 116: 593-611.
26. BAB'EVA, I. P.; AZIEVA, E. E. Taxonomic composition and ecological characteristics of yeasts occurring in tundra soils in West Taimir. *Mikologija i fitopatologija*, 1980.
27. VAZ, Aline BM, et al. The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2011, 42.3: 937-947.
28. PANCHAL, Chandra J. *Yeast strain selection: Biotechnology and Bioprocessing*. 8. 1. New York: M. Dekker, 1990, 368 s. ISBN 0824782763.
29. TATE, K. R.; ROSS, D. J.; FELTHAM, C. W. A direct extraction method to estimate soil microbial C: effects of experimental variables and some different calibration procedures. *Soil Biology and Biochemistry*, 1988, 20.3: 329-335.
30. BERG, M. P.; KNIESE, J. P.; VERHOEF, H. A. Dynamics and stratification of bacteria and fungi in the organic layers of a Scots pine forest soil. *Biology and Fertility of Soils*, 1998, 26.4: 313-322.
31. DORAN, John W. Soil microbial and biochemical changes associated with reduced tillage. *Soil Science Society of America Journal*, 1980, 44.4: 765-771.
32. SMITH, J. L.; PAUL, E. A. The significance of soil microbial biomass estimations. *Soil biochemistry*, 1990, 6: 357-396.
33. ZALAR, P., C. GOSTINČAR, G.S. DE HOOG, V. URŠIČ, M. SUDHADHAM a N. GUNDE-CIMERMAN. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Studies in Microbiology*. 2008, **61**, 21-38. DOI: 10.3114/sim.2008.61.02. ISBN 10.3114/sim.2008.61.02. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166061614601925>

34. YURKOV, A. M., A. M. SCHÄFER a D. BEGEROW. *Clavispora reshetovae*. *Fungal Planet*. 2009, **35**, 182-183. Dostupné také z: https://www.researchgate.net/publication/220030395_Clavispora_reshetovae_Fungal_Planet_35
35. WUCZKOWSKI, M., V. PASSOTH, B. TURCHETTI, et al. Description of *Holtermanniella* gen. nov., including *Holtermanniella takashimae* sp. nov. and four new combinations, and proposal of the order Holtermanniales to accommodate tremellomycetous yeasts of the Holtermannia clade. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2011, **61**, 680–689. DOI: 10.1099/ijs.0.019737-0. ISBN 10.1099/ijs.0.019737-0. Dostupné také z: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.019737-0>
36. CRESTANI, J., M. FONTES LANDELL, J. FAGANELLO, M. HENNING VAINSTEIN, H. SIMPSON VISHNIAC a P. VALENTE. *Cryptococcus terrestris* sp. nov., a tremellaceous, anamorphic yeast phylogenetically related to *Cryptococcus flavescens*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 69n. 1., **69**, 631–636. DOI: 10.1099/ijs.0.001800-0. ISBN 10.1099/ijs.0.001800-0. Dostupné také z: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.001800-0>
37. RYCHNOVSKÁ, M., E. BALÁTOVÁ-TULÁČKOVÁ, B. ULEHLOVÁ a J. PELIKÁN. *Ekologie lučních porostů*. 1. Praha: Academia, 1985, 291 s.
38. TŮMA, Ivan. *Mikrobiologie (pro zahradnické obory)*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2015. ISBN 978-80-7509-228-1.
39. Ekologie a význam hub: (místy se zvláštním zřetelem k makromycetům). *Masarykova univerzita: Přírodovědecká fakulta* [online]. Brno: Ústav botaniky a zoologie, 2012 [cit. 2016-11-24]. Dostupné z: <http://www.sci.muni.cz/botany/mycology/ekolhub.htm>
40. HOLMES, Richard. *The age of wonder: how the romantic generation discovered the beauty and terror of science*. New York: Pantheon Books, c2008. ISBN 978-0-375-42222-5.
41. FALKOWSKI, P. The Global Carbon Cycle: A Test of Our Knowledge of Earth as a System. *Science*. 2000, 290(5490), 291-296. DOI: 10.1126/science.290.5490.291. Dostupné také z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.290.5490.291>
42. An introduction to the carbon cycle. *Globe carbon cycle* [online]. Durham: The University of New Hampshire, 2011 [cit. 2016-11-28]. Dostupné z: <http://globecarboncycle.unh.edu/CarbonCycleBackground.pdf>
43. The habitable planet: Carbon Cycling and Earth's Climate. *Annenberg learner: Teacher resources and professional development across the curriculum* [online]. St. Louis, U.S.: Annenberg Learner, 2011 [cit. 2016-11-28]. Dostupné z: <http://www.learner.org/courses/envsci/unit/text.php?unit=1&secNum=4>

44. BOND-LAMBERTY, Ben a Allison THOMSON. Temperature-associated increases in the global soil respiration record. *Nature*. 2010, **464**, 579-582. DOI: 10.1038/nature08930. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature08930>
45. CARROLL, Steven B. a Steven D. SALT. *Ecology for gardeners*. Ilustrované vydání. Portland, OR, United States: Timber Press, 2004. ISBN 978-0-88192-611-8.
46. GALLOWAY, J. N., F. J. DENTENER, D. G. CAPONE, et al. Nitrogen Cycles: Past, Present, and Future. *Biogeochemistry*. 2004, **70**(2), 153-226. DOI: 10.1007/s10533-004-0370-0. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10533-004-0370-0>
47. MOIR, James W. B. (ed.). *Nitrogen cycling in bacteria: Molecular analysis*. 1. York, UK: Caister Academic Press, 2011, 250 s. ISBN 978-1-904455-86-8.
48. SMIL, Vaclav. *Cycles of life: civilization and the biosphere*. New York: Scientific American Library, c2001. Scientific American Library series. ISBN 07-167-6039-8.
49. MADIGAN, Michael T. a John M. MARTINKO. *Brock biology of microorganisms*. 11th ed. Upper Saddle River, N.J., c2006. ISBN 01-319-6893-9.
50. TURNER, Benjamin L., Emmanuel FROSSARD a Darren S. BALDWIN. *Organic phosphorus in the environment*. Cambridge, MA: CABI Pub., c2005, 432 s. ISBN 0851998224.
51. SCHLESINGER, William H. *Biogeochemistry: an analysis of global change*. San Diego: Academic Press, c1991, 441 s. ISBN 01-262-5157-6. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780126251579>
52. SINSABAUGH, R. S. Enzymic analysis of microbial pattern and process. *Biology and Fertility of Soils*. 1994, **17**(1), 69-74. DOI: 10.1007/BF00418675. ISSN 0178-2762. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00418675>
53. ALLISON, Steven D., David S. LEBAUER, M. Rosario OFRECIO, Randy REYES, Anh-Minh TA a Tri M. TRAN. Low levels of nitrogen addition stimulate decomposition by boreal forest fungi. *Soil Biology and Biochemistry*. 2009, **41**(2), 293-302. DOI: 10.1016/j.soilbio.2008.10.032. ISSN 00380717. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071708003908>
54. KLONOWSKA, Agnieszka, Christian GAUDIN, André FOURNEL, Marcel ASSO, Jean LE PETIT, Michel GIORGI a Thierry TRON. Characterization of a low redox potential laccase from the basidiomycete C30. *European Journal of Biochemistry*. 2002, **269**(24), 6119–6125. DOI: 10.1046/j.1432-1033.2002.03324.x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1432-1033.2002.03324.x>

55. YANG, Qingxiang, et al. Extracellular enzyme production and phylogenetic distribution of yeasts in wastewater treatment systems. *Bioresource technology*, 2013, 129: 264-273.
56. BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 93.6: 1020-1025.
57. MOLNÁROVÁ, Jana; VADKERTIOVÁ, Renáta; STRATILOVÁ, Eva. Extracellular enzymatic activities and physiological profiles of yeasts colonizing fruit trees. *Journal of basic microbiology*, 2014, 54.S1.
58. VODRÁŽKA, Zdeněk, Pavel RAUCH a Jan KÁŠ. *Enzymologie*. Vyd. 3. přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1998. ISBN 80-708-0330-4.
59. SVENDSEN, Allan. *Lipase protein engineering*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology. 2000, **1543**(2), 223-238. DOI: 10.1016/S0167-4838(00)00239-9. ISSN 01674838. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167483800002399>
60. VAKHLU, Jyoti. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2006, 9.1: 69-85.
61. VRŠANSKÁ, M. *Studie aktivity extracelulárních enzymů produkováných různými druhy kvasinek* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 89 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Stanislava Voběrková, Ph.D.
62. HILL, Robert a Joseph NEEDHAM. *The Chemistry of life: eight lectures on the history of biochemistry*. Dotisk. Cambridge [Eng.]: University Press, 1970, 213 s. ISBN 05-210-7379-0.
63. DJEKRIFF, D. S., GILLMANN L, BENNAMOUN L, AIT-KAKI A, LABBANI K, NOUADRI T a MERAIHI Z V. Amylolytic Yeasts: Producers of α -amylase and Pullulanase. *International Journal of Life-Sciences Scientific Research*. 2016, **2**(4), 339-354. DOI: 10.21276/ijlssr.2016.2.4.6. ISSN 24551716. Dostupné také z: http://ijlssr.com/current_issue/pdf/IJLSSR-1115-10-2015.pdf
64. DAVID L. NELSON, MICHAEL M. COX, David L. Nelson, Michael M. Cox a [ILLUSTRATIONS SUSAN TILBERRY .. ET AL.]. *Lehninger principles of biochemistry*. 3rd ed., 7th printing. New York: Worth, 2003. ISBN 15-725-9931-6.
65. SØRENSEN, Annette, Mette LÜBECK, Peter LÜBECK a Birgitte AHRING. Fungal Beta-Glucosidases: A Bottleneck in Industrial Use of Lignocellulosic Materials. *Biomolecules*. 2013, **3**(3), 612-631. DOI: 10.3390/biom3030612. ISSN 2218-273x. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2218-273X/3/3/612/>

66. FIA, G., G. GIOVANI a I. ROSI. Study of beta-glucosidase production by wine-related yeasts during alcoholic fermentation. A new rapid fluorimetric method to determine enzymatic activity. *Journal of Applied Microbiology*. 2005, **99**(3), 509-517. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2005.02657.x. ISSN 1364-5072. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2005.02657.x>
67. Worthington Enzyme Manual: Cel. *Worthington Biochemical Corporation* [online]. New Jersey: Worthington Biochemical Corporation, 2016 [cit. 2016-12-07]. Dostupné z: <http://www.worthington-biochem.com/cel/default.html>
68. THONGEKKAEW, Jantaporn a Jarupan KONGSANTHIA. Screening and Identification of Cellulase Producing Yeast. *Bioengineering and Bioscience*. 2016, **4**(3), 29-33,. DOI: 10.13189/bb.2016.040301.
69. SHIVALEE, A, M DIVATAR, G SANDHYA, A SARFARAZ a A LINGAPPA. Isolation and screening of soil microbes for extracellular chitinase activity. *Journal of Advanced Scientific Research*. 2016, **7**(2), 10-14. Dostupné také z: https://www.researchgate.net/publication/303762490_ISOLATION_AND_SCREENING_OF_SOIL_MICROBES_FOR_EXTRACELLULAR_CHITINASE_ACTIVITY
70. HAMID, Rifat, et al. Chitinases: an update. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2013, 5.1: 21.
71. SOLOMON, Edward I., Uma M. SUNDARAM a Timothy E. MACHONKIN. Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chemical Reviews*. 1996, **96**(7), 2563-2606. DOI: 10.1021/cr950046o. ISSN 0009-2665. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr950046o>
72. COHEN, L. PERSKY, Y. HADAR, R. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002, **58**(5), 582-594. DOI: 10.1007/s00253-002-0930-y. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-002-0930-y>
73. BRIJWANI, Khushal, Anne RIGDON a Praveen V. VADLANI. Fungal Laccases: Production, Function, and Applications in Food Processing. *Enzyme Research*. 2010, **2010**, 1-10. DOI: 10.4061/2010/149748. ISSN 2090-0414. Dostupné také z: <http://www.hindawi.com/journals/er/2010/149748/>
74. XU, Feng. Applications of oxidoreductases: Recent progress. *Industrial Biotechnology*. 2005, **1**(1), 38-50. DOI: 10.1089/ind.2005.1.38. ISSN 1550-9087. Dostupné také z: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ind.2005.1.38>

75. SOMOGYI, Michael, et al. Notes on sugar determination. *Journal of biological chemistry*, 1952, 195: 19-23.
76. NELSON, Norton, et al. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. biol. Chem*, 1944, 153.2: 375-380.
77. FELSE, P. A. a T. PANDA. Production of microbial chitinases – A revisit. *Bioprocess Engineering*. 2000, **23**(2), 127-134. DOI: 10.1007/PL00009117. ISBN 10.1007/PL00009117. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/PL00009117>
78. REISSIG, José L.; STROMINGER, Jack L.; LELOIR, Luis F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. *Journal of Biological Chemistry*, 1955, 217.2: 959-966.
79. DAVIDSON, E. A. [3] Analysis of sugars found in mucopolysaccharides. *Methods in enzymology*, 1966, 8: 52-60.
80. AGRAWAL, Toshy a Anil S. KOTASTHANE. Chitinolytic assay of indigenous Trichoderma isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. *SpringerPlus*. 2012, **73**(1), 2-10. DOI: 10.1186/2193-1801-1-73. ISBN 10.1186/2193-1801-1-73. Dostupné také z: <http://springerplus.springeropen.com/articles/10.1186/2193-1801-1-73>
81. ORIJ, Rick, Stanley BRUL a Gertien J. SMITS. Intracellular pH is a tightly controlled signal in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011, **1810**(10), 933-944. DOI: 10.1016/j.bbagen.2011.03.011. ISBN 10.1016/j.bbagen.2011.03.011. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416511000602>
82. WANG, Yuxia, Yan XU a Jiming LI. A Novel Extracellular β -Glucosidase from Trichosporon asahii: Yield Prediction, Evaluation and Application for Aroma Enhancement of Cabernet Sauvignon. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2012.02705.x. ISBN 10.1111/j.1750-3841.2012.02705.x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2012.02705.x>
83. STRAUSS, M.L.A., N.P. JOLLY, M.G. LAMBRECHTS a P. VAN RENSBURG. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-Saccharomyces wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*. 2001, **91**(1), 182–190. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01379.x. ISBN 10.1046/j.1365-2672.2001.01379.x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2672.2001.01379.x>
84. JÄGER, J. Parciální purifikace a charakterizace polygalakturonázy z Geotrichum_candidum.. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 54 s. Vedoucíbakalářské práce Ing. Eva Stratilová, Ph.D..

85. TRINDADE, Rita C., Maria Aparecida RESENDE, Claudia M. SILVA a Carlos A. ROSA. Yeasts Associated with Fresh and Frozen Pulps of Brazilian Tropical Fruits. *Systematic and Applied Microbiology*. 2002, **25**(2), 294-300. DOI: 10.1078/0723-2020-00089. ISBN 10.1078/0723-2020-00089. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0723202004701150>
86. DASILVA, E, M BORGES, C MEDINA, R PICCOLI a R SCHWAN. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. *FEMS Yeast Research*. 2005, **5**(9), 859–865. DOI: 10.1016/j.femsyr.2005.02.006. ISBN 10.1016/j.femsyr.2005.02.006. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1016/j.femsyr.2005.02.006>
87. P4780: Tween 80. *SIGMA-ALDRICH: A Part of Mecerck* [online]. Czech republic: Sigma-Aldrich Co., 2017 [cit. 2017-04-08]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p4780?lang=en&ion=CZ>
88. ANDREWS, J. W. a J. H. BUCK. Adhesion of yeasts to leaf. *Phyllosphere Microbiology*. St. Paul, MN, USA: The American Phytopathological, 2012, , 53-68.
89. BARNETT, J. A., M. INGRAM a T. SWAIN. The Use of B-Glucosides in Classifying Yeasts. *Microbiology*. 1956, **15**, 529-555. DOI: 10.1099/00221287-15-3-529. ISBN 10.1099/00221287-15-3-529. Dostupné také z: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-15-3-529>
90. MCMAHON, H, B W ZOECKLEIN, K FUGELSANG a Y JASINSKI. Quantification of glycosidase activities in selected yeasts and lactic acid bacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Bitechology*. 1999, **23**, 198-203. DOI: 10.1038/sj.jim.2900720. ISBN 10.1038/sj.jim.2900720. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1038/sj.jim.2900720>
91. CHAROENCHAI, C., G.H. FLEET, P.A. HENSCHKE a B.E.N.T TODD. Screening of non-Saccharomyces wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Australian Journal of Grape Wine Research*. 1997, **3**, 2-8. DOI: 10.1111/j.1755-0238.1997.tb00109.x. ISBN 10.1111/j.1755-0238.1997.tb00109.x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1755-0238.1997.tb00109.x>
92. BRIZZIO, Silvia, Benedetta TURCHETTI, Virginia DE GARCÍA, Diego LIBKIND, Pietro BUZZINI a María VAN BROOCK. Extracellular enzymatic activities of basidiomycetous yeasts isolated from glacial and subglacial waters of northwest Patagonia (Argentina). *Canadian Journal of Microbiology*. 2007, **57**(4), 519-525. DOI: 10.1139/W07-010. ISBN 10.1139/W07-010. Dostupné také z: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/W07-010>
93. CARRASCO, Mario, Juan ROZAS, Salvador BARAHONA, Jennifer ALCAÍNO, Víctor CIFUENTES a Marcelo BAEZA. Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from King George Island, the sub-Antarctic region. *BMC microbiology*. 2012, **12**(1),

251. DOI: 10.1186/1471-2180-12-251. ISBN 10.1186/1471-2180-12-251. Dostupné také z: <http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-12-251>
94. ELANGO, Narayanasamy; CORREA, Julieta U.; CABIB, E. Secretory character of yeast chitinase. *Journal of Biological Chemistry*, 1982, 257.3: 1398-1400.
95. PFISTER, Barbara a Samuel C ZEEMAN. Making Starch in Yeast: Analyzing the Enzymes Involved in Starch Biosynthesis. *Laboratory Journal*. 2017. Dostupné také z: <http://www.laboratory-journal.com/science/life-sciences-biotech/making-starch-yeast>
96. PFISTER, Barbara, Antoni SÁNCHEZ-FERRER, Ana DIAZ, et al. Recreating the synthesis of starch granules in yeast. *ELife*. 2016, **5**, 1-29. DOI: 10.7554/eLife.15552. ISBN 10.7554/eLife.15552. Dostupné také z: <http://elifesciences.org/lookup/doi/10.7554/eLife.15552>
97. SCHULTZ, John C.; ANKEL, Helmut. Biosynthesis of Glycogen and Starch in *Cryptococcus laurentii*. *Journal of bacteriology*, 1973, 113.2: 627-636.
98. LI, Haifeng, et al. Glucoamylase production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d and hydrolysis of potato starch granules by the enzyme. *Process Biochemistry*, 2007, 42.3: 462-465.

ZDROJE OBRÁZKŮ

1. RYCHNOVSKÁ, M., E. BALÁTOVÁ-TULÁČKOVÁ, B. ULEHLOVÁ a J. PELIKÁN. *Ekologie lučních porostů*. 1. Praha: Academia, 1985, 291 s.
2. SHIVALEE, A, M DIVATAR, G SANDHYA, A SARFARAZ a A LINGAPPA. Isolation and screening of soil microbes for extracellular chitinase activity. *Journal of Advanced Scientific Research*. 2016, 7(2), 10-14. Dostupné také z: https://www.researchgate.net/publication/303762490_ISOLATION_AND_SCREENING_OF_SOIL_MICROBES_FOR_EXTRACELLULAR_CHITINASE_ACTIVITY
3. AGRAWAL, Toshy a Anil S. KOTASTHANE. Chitinolytic assay of indigenous Trichoderma isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. *SpringerPlus*. 2012, 73(1), 2-10. DOI: 10.1186/2193-1801-1-73. ISBN 10.1186/2193-1801-1-73. Dostupné také z: <http://springerplus.springeropen.com/articles/10.1186/2193-1801-1-73>

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AIDS	Syndrom získaného selhání imunity
A.	<i>Aureobasidium</i>
CCY	Sbírka kultur kvasinek, CHÚ SAV, Bratislava, Slovensko
C.	<i>Candida</i>
CMC	karboxymethylcelulóza
Cr.	<i>Cryptococcus</i>
Cys.	<i>Cystofilobasidium</i>
D.	<i>Debaryomyces</i>
D1/D2	Doména genu 26S rRNA
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
G.	<i>Galactomyces</i>
G-C	Poměr zastoupení bází guanin-cystein
L.	<i>Leucosporidium</i>
M.	<i>Metschnikowia</i>
MGA	monomer kyseliny polygaktouronové
Rh.	<i>Rhodotorula</i>
RNA	Ribonukleová kyselina
rRNA	Ribozomální ribonukleová kyselina
S.	<i>Saccharomyces</i>
SHP	summer-type hypersensitivity pneumonitis
Tr.	<i>Trichosporon</i>

PŘÍLOHA

Příloha 1: Souhrnná tabulka enzymových aktivit všech testovaných kmenů půdních kvasinek

Druh kvasinky	Kmen	Druh půdy ¹	Polygalakturonáza	Lipáza	Proteáza		Celuláza	β-glukosidáza	Chitináza		α-amyláza	Tvorba škrobu podobných látek
			pektin	Tween 80	Skim milk	želatina	CMC	arbutin	S-N test ²	E test ³	škrob	
<i>Aureobasidium pullulans</i>	48	O	+	+	+	+	0	+	0	0	0	0
	CCY 27-1-134	O	+	+	+	+	+	+	0	+	+	0
	199	O	+	+	+	+	0	+	0	0	+	0
<i>Barnettozyma californica</i>	31	O	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
	118	O	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0
<i>Candida odintsovae</i>	CCY 29-174-2	K	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0
<i>Candida oleophila</i>	111	O	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0
<i>Candida solani</i>	CCY 29-23-18	K	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0
<i>Clavispora reshetovae</i>	110	O	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Naganishia (Cryptococcus) friedmannii</i>	191	O	0	+	0	0	0	+	0	0	+	+
<i>Goffeauzyma gastrica (Cryptococcus gastricus)</i>	176	O	0	+	0	0	0	+	0	0	+	+
	181	O	0	+	+	0	0	+	0	0	+	+
<i>Cryptococcus musci</i>	CCY 17-26-1	K	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+
<i>Saitozyma podzolica (Cryptococcus podzolicus)</i>	210	O	+	+	0	0	0	+	0	0	+	0
<i>Holtermanniella takashimae</i>	185	O	0	+	+	0	0	+	0	0	+	+
	220	O	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

¹ K – kontaminovaná půda, O – ovocný sad půda

² Somogyi-Nelsonův test

³ Ehrlichův test

Druh kvasinky	Kmen	Druh pŕdy	Polygalakturonáza	Lipáza	Proteáza		Celuláza	β -glukosidáza	Chitináza		α -amyláza	Tvorba škrobu podobných látek
			pektin	Tween 80	Skim milk	želatina	CMC	arbutin	S-N test	E test	škrob	
<i>Papiliotrema (Cryptococcus) terrestris</i>	49	O	+	+	0	0	0	+	0	0	0	+
	50	O	+	+	+	0	0	+	0	0	+	+
<i>Cyberlindnera misumaiensis</i>	131	O	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cyberlindnera saturnus</i>	98	O	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0
	CCY 38-7-5	K	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0
<i>Cyberlindnera suaveolens</i>	CCY 38-7-4	K	+	0	0	0	0	+	0	0	0	0
<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	177	O	+	+	0	0	0	+	0	0	0	+
	H1 'a.2	O	0	0	0	0	0	+	0	0	0	+
<i>Cystofilobasidium infirmominatum</i>	91	O	+	+	0	0	0	0	0	0	0	+
	139	O	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
<i>Cystofilobasidium macerans</i>	123	O	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+
	140	O	+	+	+	+	0	+	0	0	0	+
	145	O	+	+	+	+	0	+	0	0	0	+
<i>Debaryomyces hansenii</i>	4	O	0	+	0	0	0	+	0	0	0	0
	CCY 41-6-22	K	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0
<i>Galactomyces candidum</i>	55	O	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	143	O	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	CCY 16-3-2 (54)	O	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	CCY 16-3-4 (64)	O	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	CCY 16-3-6 (119)	O	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Galactomyces geotrichum</i>	CCY 16-1-34	K	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Galactomyces pseudocandidus</i>	CCY 16-3-1 (52)	O	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	120	O	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Issatchenkia terricola</i>	113	O	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Leucosporidium scottii</i>	165	O	0	0	+	+	0	+	0	0	0	0

Druh kvasinky	Kmen	Druh pŕdy	Polygalakturonáza	Lipáza	Proteáza		Celuláza	β -glukosidáza	Chitináza		α -amyláza	Tvorba škrobu podobných látek
			pektin	Tween 80	Skim milk	želatina	CMC	arbutin	S-N test	E test	škrob	
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	157	O	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	CCY 39-23-13	K	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0
<i>Moniliella oedocephalis</i>	109	O	0	+	+	0	0	+	0	0	0	0
<i>Pichia kluyveri</i>	100	O	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pichia manshurica</i>	106	O	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rhodotorula glutinis</i>	90	O	0	+	+	0	0	+	0	0	0	0
<i>Rhodotorula vanilica</i>	172	O	0	+	+	+	0	0	0	0	+	0
<i>Rhodotorula pustula</i>	117	O	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	136	O	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Saccharomycopsis crataegensis</i>	115	O	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0
<i>Schwanniomyces capriotti</i>	81	O	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sporidiobolus metaroseus</i>	125	O	0	+	+	0	0	0	0	+	+	0
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	77	O	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Trichosporon akiyoshidainum</i>	70	O	0	0	0	0	+	0	0	+	+	+
	CCY 5-2-1	K	0	0	0	0	0	0	0	+	0	+
<i>Trichosporon asahii</i>	11	O	+	+	+	+	0	+	0	0	+	0
	CCY 30-19-1	O	0	0	0	0	0	0	0	+	0	+
<i>Apiotrichum (Trichosporon) dulcitum</i>	69	O	0	0	0	0	+	0	0	+	0	+
<i>Trichosporon laibachii (multisporum)</i>	128	O	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+
<i>Apiotrichum (Trichosporon) porosum</i>	61	O	+	+	0	0	+	+	0	+	+	0
	127	O	+	+	0	0	0	+	0	0	+	0
	188	O	+	+	0	0	0	+	0	0	0	0
	CCY 30-18-2	K	0	+	0	0	0	+	0	0	0	0
<i>Tausonia (Trichosporon) pullulans</i>	129	O	+	+	+	+	0	+	0	0	+	+
	CCY 30-1-15	O	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+

Druh kvasinky	Kmen	Druh půdy	Polygalakturonáza	Lipáza	Proteáza		Celuláza	β-glukosidáza	Chitináza		α-amyláza	Tvorba škrobu podobných látek
			pektin	Tween 80	Skim milk	želatina	CMC	arbutin	S-N test	E test	škrob	
<i>Trichosporon scarabaeorum</i>	J5za	O	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>neidentifikováno</i>	21	O	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0